Über den Einfluß der C_8-Alkylsubstitution auf die cytostatischen Effekte von aliphatischen Alkoholen und 3,5-disubstituierten Isoxazolen

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Heide Meier-Gerwert

aus Neunkirchen

1970

Über den Einfluß der C_8-Alkylsubstitution auf die cytostatischen Effekte von aliphatischen Alkoholen und 3,5-disubstituierten Isoxazolen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

H e i d e M e i e r - G e r w e r t

aus Neunkirchen

1970

Tag der mündlichen Prüfung 19. 11. 1970

Dekan:	Professor Dr. E. Bayer
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter:	Dozent Dr. Dr. W. Frank

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn

Professor Dr. Dr. G ü n t h e r W e i t z e l

am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die Zuweisung des Themas und für die mir während dessen Bearbeitung jederzeit erwiesene großzügige Förderung.

Der mikroanalytischen Abteilung des Physiologisch-chemischen Instituts unter Leitung von Frau Dr. Anna-Maria Fretzdorff danke ich für analytische Arbeiten.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung..... 7

2. Synthesen und Eigenschaften der untersuchten Substanzen..... 9

A. Alkohole..... 9

B. Aliphatische Oxoverbindungen der Hauptkettenlänge C_8..... 15

a) Aldehyde..... 15

b) β-Diketone, α-β-ungesättigte Ketone..... 16

C. Isoxazole..... 17

3. Prüfung der Substanzen auf carcinostatische Wirksamkeit..... 29

A. Einwirkung der Verbindungen auf das Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom in vitro..... 29

a) Einfluß auf DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese.. 29

b) Einfluß der Verbindungen auf die Membranpermeabilität..... 41

B. Einwirkung der Verbindungen auf das Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo..... 43

C. Einwirkung der Verbindungen auf andere Transplantationstumoren..... 51

4. Einwirkung der Verbindungen auf andere biochemische Systeme..... 52

A. Beeinflussung der osmotischen Resistenz von Erythrocyten..... 52

B. Einwirkung auf die adrenalininduzierte Lipolyse an isolierten Fettzellen..... 55

5. Bestimmung des Dipolmoments..... 58

6. Diskussion..... 59

7. Beschreibung der Versuche..... 60

A. Allgemeines..... 60

B. Synthesen..... 62

a) Äthylverzweigte Octanole..... 62

b) Äthylverzweigte Octanale..... 67

c) α-β-ungesättigte Ketone..... 69

d) β-Diketone..... 70

e) Isoxazole..... 71

C. Biochemische Versuche..... 76

a) Einbauversuche mit radioaktiv markierten Metaboliten..... 76

b) Versuche an Tumortieren..... 77

c) Versuche mit Erythrocyten..... 77

d) Fettzellentest..... 78

8. Zusammenfassung..... 79

9. Literaturverzeichnis..... 81

1. Einleitung und Problemstellung

Vor einigen Jahren fanden Weitzel und Mitarbeiter[1], daß die Alkohole und Aldehyde der mittleren Kettenlängen (C_8 - C_{12}) das Ehrlich-Ascites-Carcinom der Maus im Wachstum zu hemmen vermögen. In der Literatur wurde aliphatischen Verbindungen dieser Art im Hinblick auf ihre cytostatische Wirksamkeit bislang nur wenig Beachtung geschenkt, da man ihnen nur "unspezifische Membraneffekte" zuschrieb. Denn bekanntlich ist es das Ziel der Chemotherapie des Krebses, lebenswichtige, für die Tumorzelle spezifische Stoffwechselwege zu treffen, und auf diese Weise ihr Wachstum zu hemmen, ohne die Funktionen gesunder Zellen zu beeinträchtigen. Daß den zahlreichen Bemühungen[2,3], diese Forderung zu erfüllen, bisher so wenig Erfolg beschieden war, hat im wesentlichen zwei Gründe: die geringfügigen biochemischen Unterschiede zwischen malignen und gesunden Zellen erschweren einen gezielten Eingriff in den Stoffwechsel des Tumorgewebes, und die Unterschiedlichkeit der Tumoren untereinander erfordert eine für jede Carcinomart spezielle Therapie.

Auf der Suche nach neuen Angriffspunkten für die Chemotherapie entdeckten in den letzten Jahren mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, daß sich die Tumorzelle in ihren Membraneigenschaften erheblich von der gesunden Zelle unterscheidet, z.B. in der Permeabilität[4], der chemischen Zusammensetzung[5] und den elektrischen

Eigenschaften[6]. Das Ausbleiben der "Kontakthemmung"[7] in Kulturen neoplastischer Zellen ist ebenfalls Ausdruck eines Verlustes wachstumsregulatorischer Funktionen der äußeren Zellmembran, d.h. während gesunde Zellen bei Zellkontakt das Wachstum einstellen, vermehren sich Krebszellen ungehemmt weiter. Unabhängig von der vieldiskutierten Frage[8], ob die Cancerogenese primär durch Membranschädigungen ausgelöst wird, steht fest, daß diese als Folgeerscheinung der Tumorentstehung stets zu beobachten sind. Gelänge es, selektiv einen chemischen Angriff gegen die vorgeschädigten Membransysteme der Krebszelle zu führen, so würde die Zelle gleichzeitig in vielen lebenswichtigen Funktionen getroffen und wirkungsvoller im Wachstum beeinträchtigt als durch die Blockierung eines einzelnen Stoffwechselweges.

Das in diesem Zusammenhang neu erwachte Interesse an membranaktiven Substanzen war der Ausgangspunkt für eine gründlichere Untersuchung der Alkohole und Aldehyde der mittleren Kettenlängen. Aus früheren Arbeiten[1] war bekannt, daß das Wirkungsoptimum bei einer Hauptkettenlänge von 8 C-Atomen liegt. In der Folge konnten Weitzel und Jackisch[9] diesen Befund noch vertiefen; durch Einführung eines Alkylrestes in 2- oder 3-Stellung ließ sich die carcinostatische Aktivität des 1-Octanols steigern, während ein ω-Phenylrest keinen wesentlichen Einfluß auf die cytostatischen Eigenschaften ausübte.

Im Rahmen dieser Untersuchungen unseres Arbeitskreises soll in der vorliegenden Arbeit die Frage nach dem wirksamen Strukturprinzip dieser Verbindungsklasse weiterbearbeitet werden. Ergänzend zur Arbeit von R. Jackisch[9] soll die Abhängigkeit des cytostatischen Effektes der verzweigten Octanole vom Ort der Alkylsubstitution geprüft und eine Verbesserung der Eigenschaften hinsichtlich Toxizität und carcinostatischer Wirksamkeit erzielt werden, z.B. durch Einführung anderer funktioneller Gruppen in das Molekül unter Beibehaltung der aliphatischen C_8-Kette.

2. Synthesen und Eigenschaften der untersuchten Substanzen

A. Alkohole

In früheren Arbeiten über alkylverzweigte Fettsäuren beobachteten Weitzel und Mitarb.[10], daß ein Zusammenhang besteht zwischen der tuberkulostatischen Wirkung dieser Säuren und dem Abstand der Methylverzweigung von der hydrophilen Endgruppe des Moleküls. Durch vergleichende Messungen der Grenzflächeneigenschaften konnte dieser Befund als Grenzflächenreaktion der Fettsäuren an der Außenschicht des Bakteriums gedeutet werden. Dementsprechend wurden physikalisch-chemische Moleküleigenschaften auch für den cytostatischen Effekt der verzweigten Octanole vermutet. Außerdem war zu erwarten, daß je

nach Stellung der Alkylverzweigung im Molekül der enzymatische Abbau der Alkohole im Organismus erschwert sein dürfte, und daß dieser Effekt zusätzlich einen indirekten Einfluß auf die cytostatische Aktivität ausüben könnte. Die Frage nach der Abhängigkeit der biologischen Wirkung vom Ort der Alkylsubstitution wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der 1-Octanole mit "durchwandernder Äthylgruppe" geprüft.

Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit den pharmakologischen Eigenschaften aliphatischer Alkohole insbesondere hinsichtlich des Stoffwechsels[11], der Toxizität[12] und der narkotischen Wirksamkeit[13,15]. Das Interesse vieler Forscher richtet sich in besonderem Maße auf den Wirkungsmechanismus der Narkose. Zu dessen Erklärung werden viele Theorien[13,14,15,16,17] entwickelt, denen bisher jedoch nur spekulative Bedeutung zukommt. Es darf jedoch als gesichert gelten, daß die Zellmembran als Angriffsort der Narkotika angesehen werden kann. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessieren vor allem Literaturangaben über Toxizität und Stoffwechsel der Alkohole der mittleren Kettenlängen: In vergleichenden Untersuchungen "in vitro" beobachteten H. Welch und G.G. Slocum[12] einen Anstieg der Toxizität gegenüber isolierten Gewebszellen mit dem Molekulargewicht der primären Alkohole, d.h. vom Methanol zum Octanol hin. Ein völlig anderes Verhalten zeigen die

Alkohole in Experimenten "in vivo" mit oralen Gaben: zunächst steigt die Toxizität an bis zum Butanol, um dann zum Octanol hin wieder abzufallen. Aus Stoffwechseluntersuchungen[11] geht hervor, daß im Organismus zwei verschiedene metabolische Routen des Alkoholabbaus miteinander konkurieren:

1) Die Oxidation über den Aldehyd zur Säure und Weiterabbau über die β-Oxidation.
2) Die Ausscheidung als Glucuronid.

Bei primären aliphatischen Alkoholen ist die Oxidation bevorzugt, so werden Methyl- bis Decyloctanol zu weniger als 10% als Glucuronid ausgeschieden. Die Konjugation mit Glucuronsäure betrifft hauptsächlich tertiäre, und in geringem Maße auch sekundäre Alkohole. Verzweigte primäre Alkohole werden zunächst zu den Säuren oxidiert, bei Vorliegen einer α-Methylverzweigung werden diese über die β-Oxidation weiter abgebaut, ein größerer Alkylrest blockiert jedoch den enzymatischen Abbau im Fettsäurestoffwechsel. In diesem Falle wird die Säure zu etwa 90% als Ester-Glucuronid ausgeschieden und nur zu einem geringen Teil der Weiteroxidation unterworfen.

Trotz der Vielzahl von Publikationen über Alkohole sind äthylverzweigte Octanole bisher noch nicht auf ihre biologischen Eigenschaften hin untersucht worden. Von den sechs Struktur-Isomeren werden drei in der Literatur beschrieben. 3-Äthyloctanol-(1) und 4-Äthyloctanol-(1)

wurden von P.A. Levene[18] und W. Keil[19] durch Reduktion der Ester der entsprechenden Säuren gewonnen, 6-Äthyl-octanol-(1) wurde von F.S. Prout[20] synthetisiert.

Zur Synthese der äthylverzweigten Octanole wurden in der vorliegenden Arbeit unter den zahlreichen präparativen Möglichkeiten zur Gewinnung primärer aliphatischer Alkohole zwei Verfahren ausgewählt:

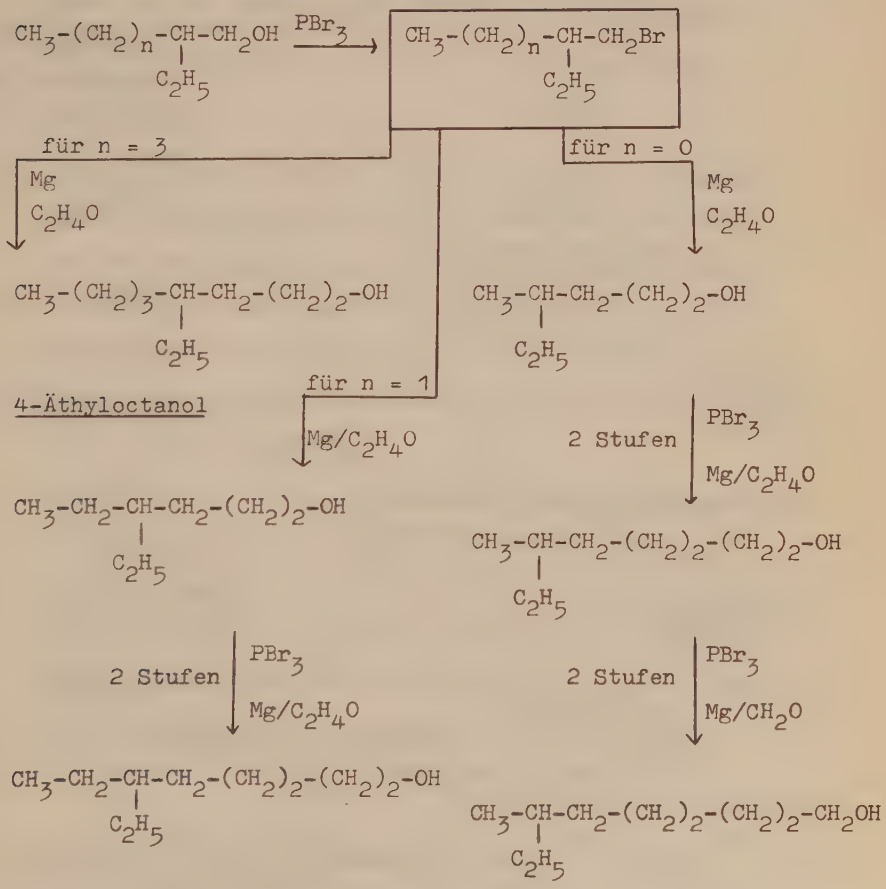
1) Die Kettenverlängerung eines Bromids über eine Grignardreaktion mit Äthylenoxid oder Formaldehyd.
2) Die Reduktion eines über Malonestersynthese[21] gewonnenen Säurechlorids zum Alkohol.

Die erste, schon von F.S. Prout[20] angewandte Methode, besitzt den Nachteil, daß sich, besonders im Fall sekundärer Bromide - viele Nebenprodukte bilden, die die Ausbeuten vermindern und die Reinigung des Endprodukts erschweren. Trotzdem wurde dieses Verfahren bevorzugt, da es über verhältnismäßig wenig Zwischenstufen zum gewünschten Alkohol führt. Die zweite, über Malonestersynthesen führende Methode, liefert hohe Ausbeuten und reinere Produkte. Da aber bis zur Erreichung des Endprodukts wesentlich mehr Reaktionsschritte notwendig sind, ist infolge der großen Zahl der Zwischenstufen die Gesamtausbeute an Alkohol, bezogen auf die Ausgangsverbindung, auch nicht höher als im Falle der Grignardreaktion über Äthylenoxid bzw. Formaldehyd. Daher wurde die Darstellungsweise über Malonestersynthesen nur im Falle des 2-Äthyl-octanols angewandt.

Im folgenden wird ein Überblick gegeben über die einzelnen Reaktionsschritte zur Darstellung der Reihe der äthylverzweigten Octanole:

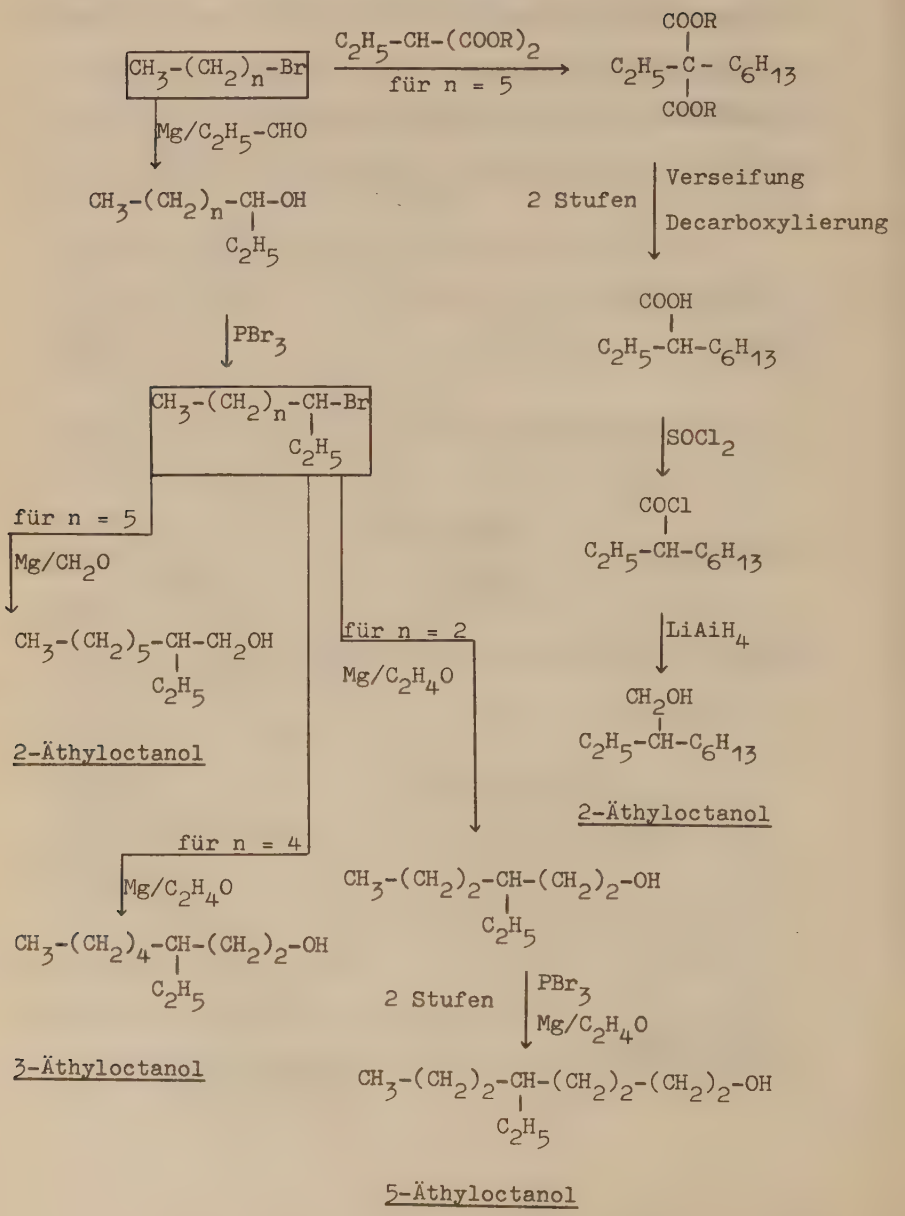
Schematischer Aufbau von

4-Äthyl-, 6-Äthyl- und 7-Äthyloctanol-(1):



Schematischer Aufbau von

2-Äthyl-, 3-Äthyl-, 5-Äthyloctanol-(1):



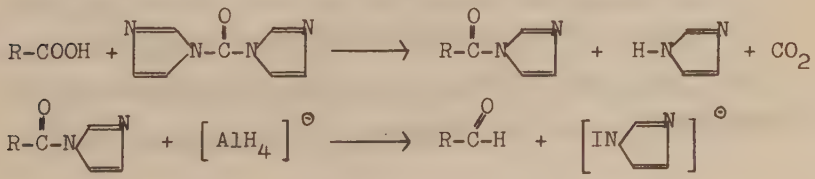
B. Aliphatische Oxoverbindungen der Hauptkettenlänge C_8

Zum Vergleich der cytostatischen Wirksamkeit mit den Alkoholen wurde eine Gruppe strukturähnlicher Verbindungen gleicher Hauptkettenlänge, jedoch mit anderen funktionellen Gruppen - hauptsächlich Carbonylgruppen - untersucht.

a) Aldehyde

In der Literatur sind die Angaben über die carcinostatische Wirksamkeit aliphatischer Aldehyde widersprüchlich. So beschreibt Strong[22] die Wachstumshemmung des Spontan-Mammacarcinoms der Maus unter der Einwirkung von Heptanal; andere Autoren[23,24] beobachteten jedoch keine cytostatischen Effekte der von ihnen untersuchten aliphatischen Aldehyde.

Zur Prüfung dieser Frage wurden einige äthylverzweigte Octanale dargestellt, die bisher noch nicht in der Literatur beschrieben sind: 2-, 3-, 4- und 6-Äthyloctanal. Die Darstellung der 2- und 3-substituierten Aldehyde gelang in guten Ausbeuten über die Reduktion der Imidazolide der entsprechenden Carbonsäuren, eine Methode, die von H.A. Staab und Mitarb.[25] eingeführt wurde.



Die Säuren werden entweder durch Oxidation des entsprechenden Alkohols oder über Malonestersynthese gewonnen.

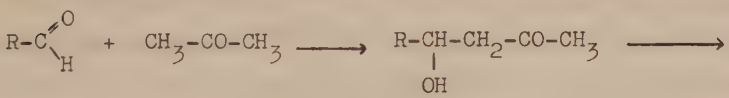
Die katalytische Dehydrierung von 4- und 6-Äthyloctanol am Silberkontakt führte zu den 4- und 6-Äthyloctanalen. Hierzu wurde eine von den Farbwerken Bayer[26] entwickelte Dehydrierungsapparatur in etwas abgewandelter Form verwendet. Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses apparativ etwas umständlichen Verfahrens ist, daß eine der Größe der Apparatur entsprechende Menge Alkohol vorliegt, da sonst die Ausbeuten zu niedrig werden und Verunreinigung der Aldehyde mit Alkohol eintritt. Die Aldehyde wurden gaschromatographisch auf Reinheit geprüft und als Dinitrophenylhydrazone charakterisiert.

b) β-Diketone, α-β-ungesättigte Ketone

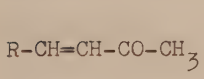
Als Vertreter dieser Stoffklassen wurden einige Beispiele ausgewählt:
Octan-2,4-dion[27]
5-5-Dimethylhexan-2,4-dion[28]
5-Methyloctan-2,4-dion[29]
Octen-(3)on-(2)[30]
5-Methylocten-(3)on-(2)[31]

Die Diketone wurden über eine Claisen-Kondensation aus Keton und Ester dargestellt und über das Kupfersalz gereinigt[32]. Eine modifizierte Aldolkondensation[33,34]

und anschließende Wasserabspaltung mit Acetanhydrid führte zu den ungesättigten Ketonen.



$$R\text{-}C(=O)\text{-}H + CH_3\text{-}CO\text{-}CH_3 \longrightarrow R\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}CH_3 \longrightarrow$$



$$R\text{-}CH{=}CH\text{-}CO\text{-}CH_3$$

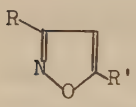
C. Isoxazole

Es ist anzunehmen, daß die vorstehend beschriebenen äthylverzweigten Octanole und Oxoverbindungen einem raschen enzymatischen Abbau im Stoffwechsel unterliegen. Für die cytostatische Wirksamkeit im Tierkörper ist es aber notwendig, daß die Verweildauer der betreffenden Verbindung im Organismus genügend hoch ist. Um die enzymatische Angreifbarkeit der Octylverbindungen zu erschweren, wurde daher geprüft, ob die Einführung eines geeigneten Ringsystems in die Kette die cytostatischen Effekte unterstützt. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür der Isoxazolring gewählt.

Die verschieden substituierten Isoxazole sind Bestandteile zahlreicher Pharmaka und zeigen ein ganzes Spektrum pharmakologischer Effekte[35,36]; sehr häufig finden sich unter ihnen Analgetica und Antipyretica insbesondere bei OH-, NH_2-, Halogenalkyl- und Halogenaryl-Substitution[37,38,39].

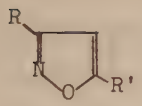
Verhältnismäßig wenig untersucht wurden die alkylsubstituierten Isoxazole, lediglich das 3,5-Dimethylisoxazol gewann zunehmend an Interesse in den letzten Jahren. So berichteten C. Gerritsen et al.[40-44] über Einflüsse des Dimethylisoxazols und des ersten Abbauprodukts im Organismus, des 5-Carboxy-3-methylisoxazols, auf Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Über carcinostatische Effekte von Dimethylisoxazol oder homologer Verbindungen ist nichts bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Gruppe von verschiedenen 3,5-disubstituierten Isoxazolen zur Prüfung ihrer cytostatischen Wirkung dargestellt. Zur Ermittlung der wirksamen Kohlenstoffzahl der Alkylkettenlänge wurden die symmetrischen Isoxazole vom Dimethyl- bis zum Dipentylderivat synthetisiert:



R = R' = CH_3-[45], C_2H_5-[46], C_3H_7-, C_4H_9-, C_5H_{11}-

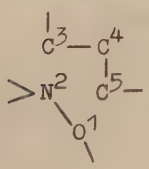
Um den Einfluß einer Verzweigung im Alkylrest auf den cytostatischen Effekt zu untersuchen und die Frage zu prüfen, welches der beiden Strukturisomeren (bei unsymmetrischer Substitution) die wirksamere Verbindung ist, wurden verzweigte und unverzweigte Isomerenpaare dargestellt:



R	R'
$CH_3-(CH_2)_3-CH_2-$	$CH_3-CH_2-CH_2-$
$CH_3-CH_2-CH_2-$	$CH_3-(CH_2)_3-CH_2-$
$-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_3$	$CH_3-CH_2-CH_2-$
$CH_3-CH_2-CH_2-$	$-CH(CH_3)-CH_2-CH_2-CH_3$
$-CH(C_2H_5)_2$	$CH_3-CH_2-CH_2-$
$CH_3-CH_2-CH_2-$	$-CH(C_2H_5)_2$
$-CH(C_2H_5)-CH_2-CH_2-CH_3$	$CH_3-CH_2-CH_2-$

Die bekanntesten Verfahren zur Darstellung von Isoxazolen[47] lassen sich im wesentlichen in zwei Typen gliedern:

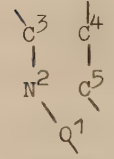
a) Der Ring wird geschlossen zwischen O^1-C^5 und N^2-C^2



Das C_3-Bruchstück liefern β-Diketone, β-Ketoaldehyde, α-Acetylenketone u.a. Ein Beispiel für diesen Reaktionstyp ist die Einwirkung von Hydroxylamin

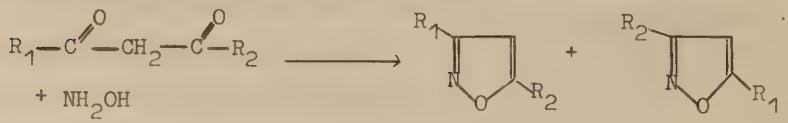
auf β-Diketone:

b) Der Ring wird an O^1- C^5 und C^3- C^4 zusammengefügt:

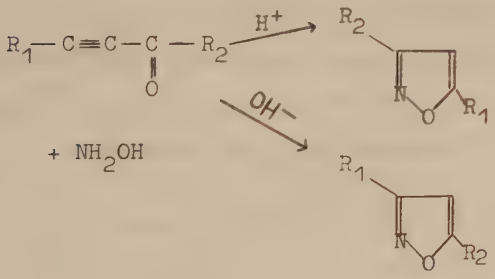


Beispiele hierfür sind die Reaktionen zwischen Hydroxamsäurechloriden und Natriumactyliden, Nitriloxyden und β-Dicarbonylverbindungen, Nitriloxyden und Acetylenen:

Viele dieser Verfahren besitzen jedoch den Nachteil, daß bei der Darstellung unsymmetrischer 3,5-disubstituierter Isoxazole Isomerengemische entstehen, die schwer zu trennen sind. So entstehen z.B. aus β-Dicarbonylverbindungen und Hydroxylamin meistens beide Isomere:



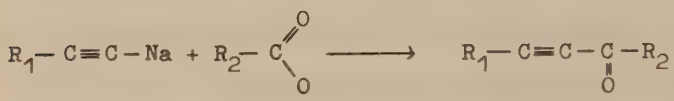
Diese Methode ist jedoch sehr geeignet zur Herstellung symmetrischer Isoxazole und wurde daher in dieser Arbeit angewandt zur Darstellung der 3,5-dialkylsubstituierten Derivate des Dimethyl- bis Dipentylisoxazols. Sind R_1 und R_2 verschieden und übt einer der beiden Reste einen stark positivierenden Einfluß auf das benachbarte C-Atom aus, so entsteht das Isomere als Hauptprodukt, welches den positivierenden Rest am C^3 trägt. Dieser Effekt läßt sich jedoch nicht ausnutzen zur Darstellung unsymmetrischer Dialkylisoxazole. In diesem Fall erweist es sich als notwendig, von Synthesen auszugehen, die nur ein Isomeres entstehen lassen. Unter den präparativen Möglichkeiten zur Darstellung einheitlicher 3,5-disubstituierter Isoxazole fiel die Wahl auf eine von Moureu[48] entdeckte, später von Weygand und Bauer[49] verbesserte Methode, die je nach Reaktionsmedium die Synthese beider Isomeren gestattet:



Wenn auch die Beweisführung Weygands für die von ihm vorgeschlagene Struktur der Isoxazole später auf Kritik stieß

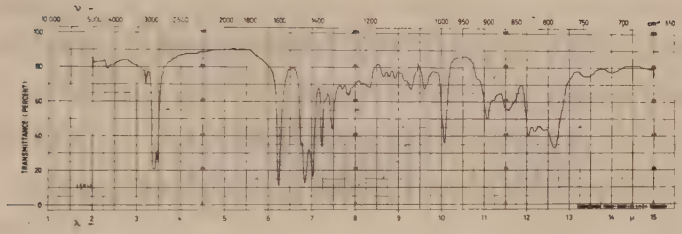
(siehe A. Quilico[47]) wurde die Richtigkeit seiner Ergebnisse von R. Shotter et al.[50] im Jahre 1969 erneut bestätigt.

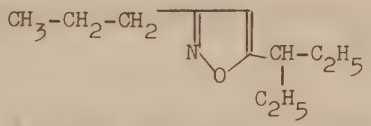
Die zu dieser Synthese notwendigen Acetylenketone wurden nach W. Manchot[51] hergestellt aus dem Na-Salz des entsprechenden Acetylens und dem Säurechlorid:

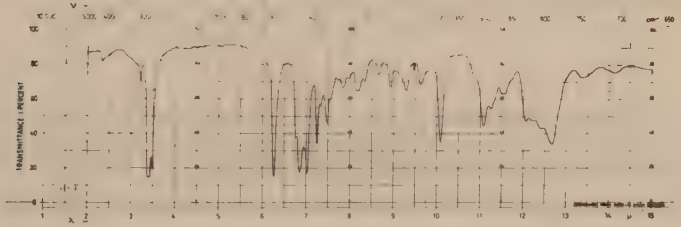


Die auf diese Weise erhaltenen Isoxazole wurden gaschromatographisch auf Reinheit geprüft und mit Hilfe der Spektren charakterisiert. Als Beispiel werden im folgenden die Spektren der beiden Isomeren 3-(1'-Äthylpropyl)-5-propylisoxazol und 5-(1'-Äthylpropyl)-3-propylisoxazol diskutiert. Die IR-Spektren unterscheiden sich erwartungsgemäß nur in der "fingerprint"-Region, im übrigen zeigen beide eine gute Übereinstimmung der Absorptionen hinsichtlich Lage und Intensität mit den in der Literatur[52] angegebenen Werten für 3,5-disubstituierte Isoxazole.

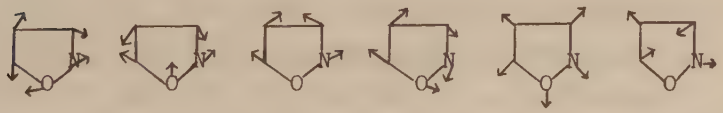
1) IR-Spektrum von



2) IR-Spektrum von 



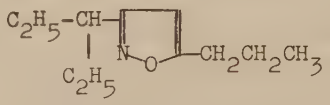
Nach A.J. Boulton[52] besitzt das Isoxazolmolekül folgende Schwingungsmöglichkeiten:

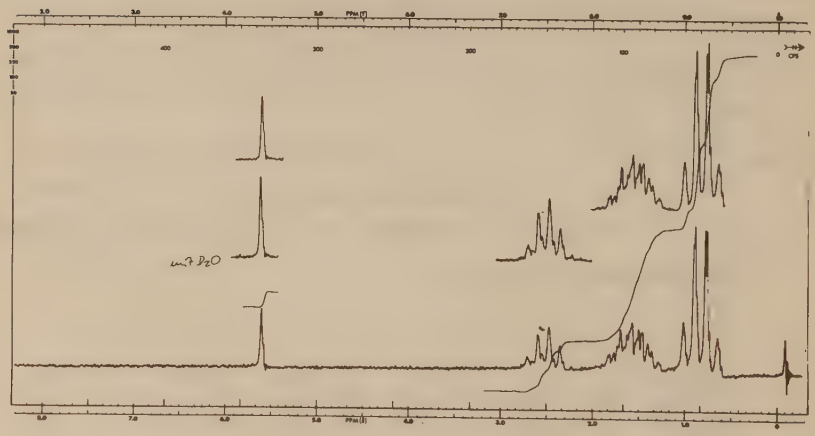


1) 2) 3) 4) 5) 6)

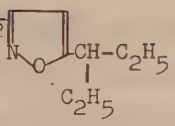
Die Banden bei 1603, 1483, 1462 und 1429 cm^{-1} im Spektrum 1 und 1596, 1477, 1460 und 1426 cm^{-1} im Spektrum 2 können den Ring "Stretching"-Schwingungen 1 - 4 zugeordnet werden. Die der Ring "breathing"-Schwingung 5 entsprechende Absorption bei 992 cm^{-1} ist in beiden Spektren verhältnismäßig stark ausgeprägt im Vergleich zu anderen 3,5-disubstituierten Isoxazolen[52]. Die Ring "deformation"-Bande bei 903 cm^{-1} stimmt in Lage und Intensität gut überein mit den Literaturangaben.

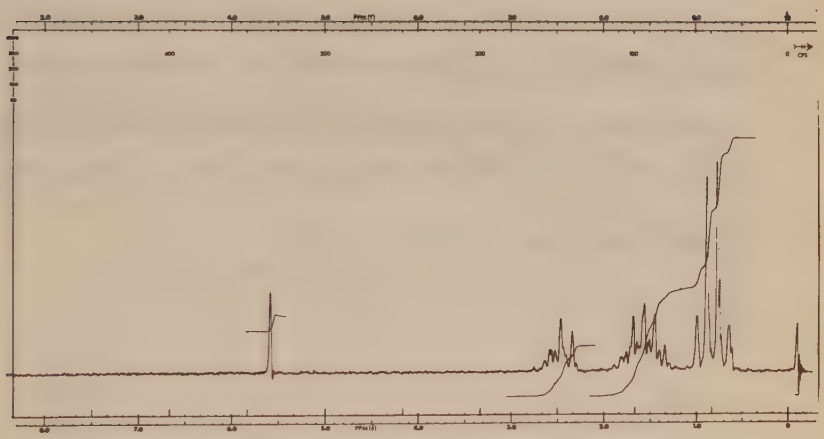
Auch die Kernresonanzspektren zeigen die zu erwartenden Signale:

1) NMR-Spektrum von 



Eine kleine Menge des anderen Isomeren kann als Verunreinigung auftreten.

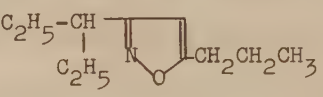
2) NMR-Spektrum von $CH_3CH_2CH_2$- 

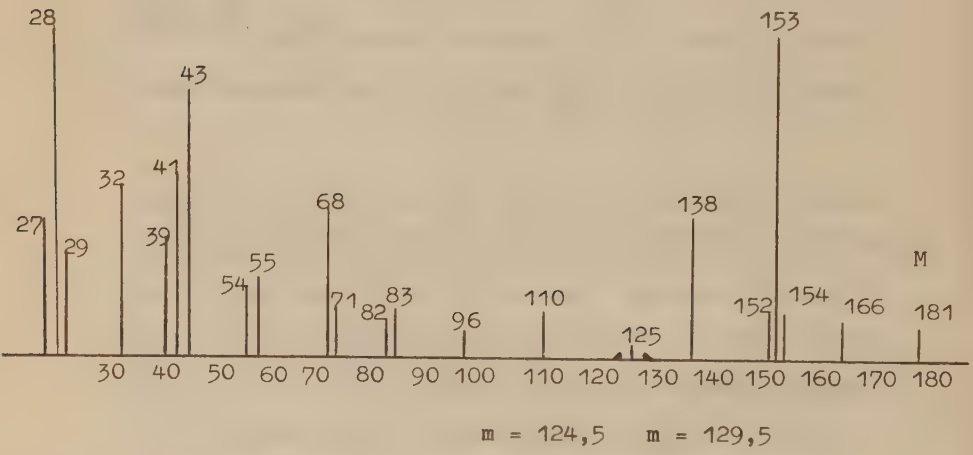


Das Singulett bei 4,3 τ geht auf das olefinische Proton am C^4 zurück. (Zum Vergleich: das entsprechende Signal für Diäthylisoxazol liegt bei 4,3 τ [53]). Es wäre zu erwarten, daß das NMR-Signal einer Methingruppe in 5-Stellung des Isoxazolrings bei höherem Feld liegt, als das einer Methingruppe in 3-Stellung, bedingt durch die Nachbarschaft des Sauerstoffs. (So beträgt der τ-Wert der Methylgruppe für 3-Methylisoxazol 7,67, für 5-Methylisoxazol 7,55 [54]). Dieser Effekt läßt sich jedoch im vorliegenden Fall nicht beobachten, da das Triplett der α-Methylengruppe mit dem Multiplett der Methingruppe überlappt bei 7,4 τ. Die Multipletts bei 8,35 und 9,1

sind den β-Methylengruppen und den Methylgruppen der Alkylreste zuzuordnen. Das Intensitätsverhältnis beträgt 11,2 : 33 : 69 : 99 bzw. 1,1 : 3,3 : 7,1 : 11,3 und entspricht den theoretischen Werten 1 : 3 : 6 : 9 innerhalb der Fehlergrenzen.

Die Massenspektren der beiden Isoxazole sind sehr ähnlich, eine Erscheinung, die man häufig bei Isomeren beobachtet:

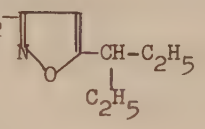
1) Massenspektrum von 

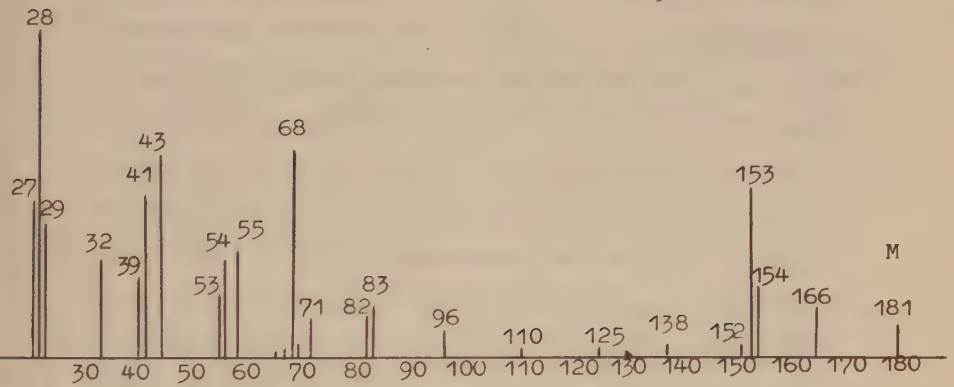


Die neben dem Molekülpeak M auftretende Peak der Masse 166 deutet auf die Abspaltung eines CH_3-Bruchstücks aus dem Molekülion. Zwei metastabile Peaks im Spektrum 1 bei 129,5 und 124,5 zeigen den Übergang an von 181 nach 153 (aus der Berechnung : 153^2 : 181 = 129,5) und von 153 nach 138

(aus 138^2 : 153 = 124,5). Das bedeutet den Verlust zweier Bruchstücke der Masse 28 und 15. Hiermit läßt sich der Zerfall im Massenspektrometer vielleicht folgendermaßen formulieren: (Vergleiche auch die Massenspektren von Dimethylisoxazol und Diphenylisoxazol, H. Nakata et al.[55,56]).

2) Massenspektrum von $CH_3CH_2CH_2$-

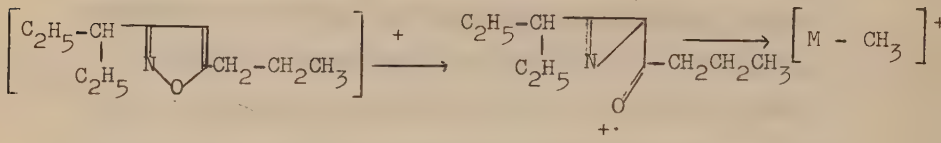




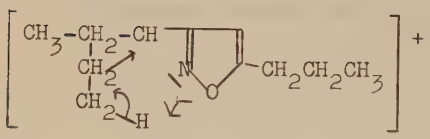
m = 129,5

Es ist natürlich gleichzeitig auch möglich, daß die Methylgruppe sich aus der Propylgruppe des Bruchstücks der Masse 153 abspaltet, hiermit wäre dann das Auftreten der Peaks der Masse 82 (durch Verlust einer Methylgruppe 68) und 55 erklärt. Die beiden Spektren unterscheiden sich hauptsächlich im Intensitätsverhältnis der Peaks 153 und 138 und dem Fehlen des metastabilen Peaks bei 124,5 im Spektrum 2. Dies läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß der cyclische Übergangszustand nur Eliminierung von C_2H_4

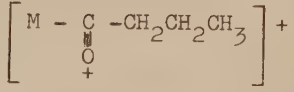
für 5-(1'Äthylpropyl-3-propylisoxazol weniger wahrscheinlich ist.



M = m/e = 181



181

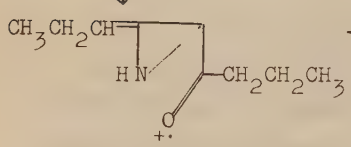


166

181

$-C_2H_4$

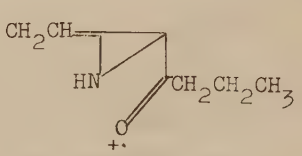
m = 129,5



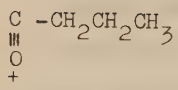
153

$-CH_3$

m = 124,5



138



71

3. Prüfung der Substanzen auf carcinostatische Wirksamkeit

A. Einwirkung der Verbindungen auf das Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom in vitro

a) Einfluß auf DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese

Eine von Weitzel und Mitarb.[57] entwickelte Methode gestattet einen Einblick in das intrazelluläre Stoffwechselgeschehen von Asciteszellen, die unter der Einwirkung eines cytostatisch wirksamen Stoffes stehen: Eine Asceteszellsuspension wird mit der zu prüfenden Substanz inkubiert und die DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese zeitlich verfolgt mit Hilfe radioaktiv markierter Vorstufen, die die Zelle in die entsprechenden Makromoleküle einbaut. Liegt der Angriffspunkt des Cytostatikums in einem dieser drei Systeme, so ist der Einbau der radioaktiven Vorstufe gehemmt im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Mißt man in Abständen von 30 min die Einbauraten von ^{14}C-markiertem Thymidin, Uridin und Leucin für die Reihe der äthylverzweigten Octanole, so ergibt sich das in Abb. 7 - 9 dargestellte Bild:

Einbauraten von ^{14}C-Thymidin bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung einer $2 \cdot 10^{-4}$ molaren Suspension von:

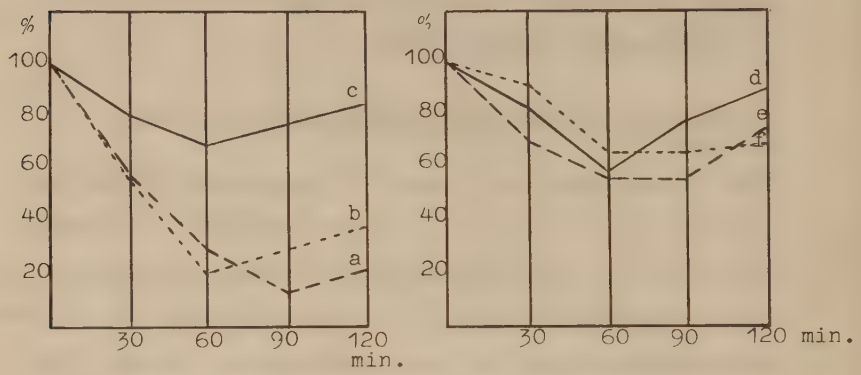


Abb. 7)

a) = 2-Äthyloctanol-(1)
b) = 3-Äthyloctanol-(1)
c) = 4-Äthyloctanol-(1)
d) = 5-Äthyloctanol-(1)
e) = 6-Äthyloctanol-(1)
f) = 7-Äthyloctanol-(1)

Einbauraten von ^{14}C-Uridin bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung einer $2 \cdot 10^{-4}$ molaren Suspension von:

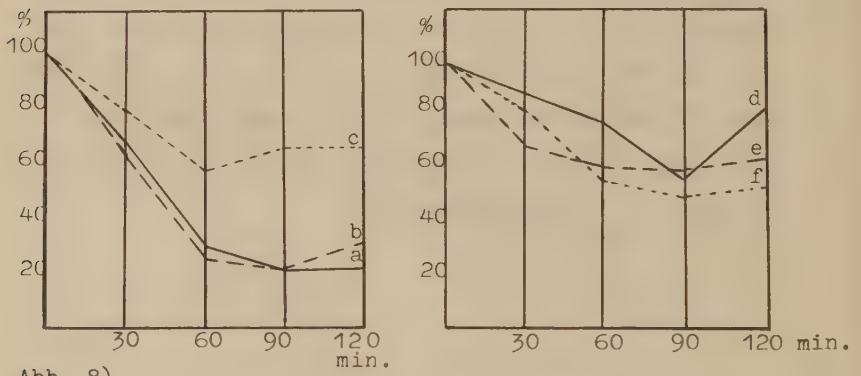


Abb. 8)

a) = 2-Äthyloctanol-(1)
b) = 3-Äthyloctanol-(1)
c) = 4-Äthyloctanol-(1)
d) = 5-Äthyloctanol-(1)
e) = 6-Äthyloctanol-(1)
f) = 7-Äthyloctanol-(1)

Einbauraten von ^{14}C-Laucin bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung einer $2 \cdot 10^{-4}$ molaren Suspension von:

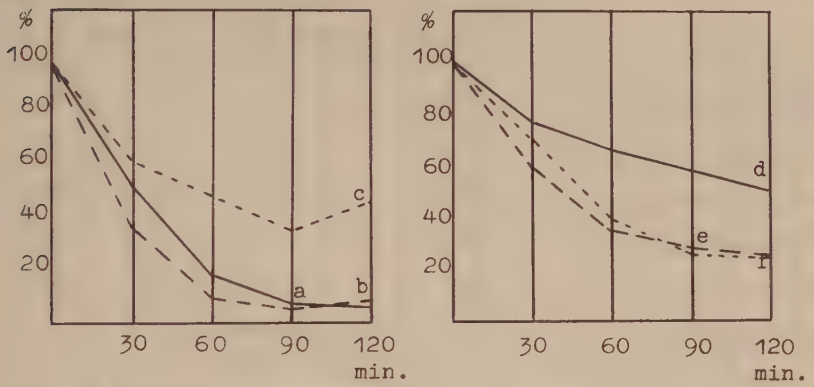


Abb. 9

a) = 2-Äthyloctanol-(1)
b) = 3-Äthyloctanol-(1)
c) = 4-Äthyloctanol-(1)
d) = 5-Äthyloctanol-(1)
e) = 6-Äthyloctanol-(1)
f) = 7-Äthyloctanol-(1)

Aus der fast gleichmäßigen Senkung aller drei Parameter ist zu ersehen, daß die äthylverzweigten Octanole keine spezifischen Angriffspunkte in der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese besitzen.

Der Leucineinbau wird etwas stärker gehemmt als der Thymidin- und Uridineinbau, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant genug, um daraus eine spezifische Hemmung der Proteinbiosynthese abzuleiten. Ein Vergleich der Alkohole untereinander zeigt, daß die 2- und 3-Äthyloctanole die wirksamsten Verbindungen sind.

Verbindung: Konz. = $2 \cdot 10^{-4}$ m	^{14}C-Thymidin-Einbauhemmung nach 30 min	^{14}C-Uridin-Einbauhemmung nach 30 min	^{14}C-Leucin-Einbauhemmung nach 30 min
2-Methyloctanol-(1)*	17,9 %	6,7 %	10 %
3-Methyloctanol-(1)	17 %	5,6 %	7,5 %
4-Methyloctanol-(1)	22,3 %	12,9 %	10,4 %
5-Methyloctanol-(1)	19,9 %	9,5 %	9,5 %
6-Methyloctanol-(1)	36 %	27,7 %	32,3 %
7-Methyloctanol-(1)	31,5 %	24,3 %	24,6 %

Tab. 1 Hemmung der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese durch Einwirkung methylverzweigter Octanole (Kontrolle = 100 %).

Die methylverzweigten Octanole zeigen ein ähnliches Verhalten in diesem Test, aber hier sind nur geringfügige Unterschiede in der Wirksamkeit der 2- und 3-substituierten Verbindungen im Vergleich zu den übrigen Methyloctanolen vorhanden. Die den alkylverzweigten Octanolen entsprechenden Aldehyde zeigen eine viel schwächere Wirkung gegenüber Ascitestumorzellen in vitro. Abb. 10 - 12 zeigt eine Gegenüberstellung der Einbauraten aus Experimenten mit Alkohol-Aldehyd-Paaren, die im gleichen Versuch in gleichen Konzentrationen $2 \cdot 10^{-4}$ eingesetzt waren:

* Für die freundliche Überlassung der methylverzweigten Octanole in dieser Messung danke ich Herrn Dr. D. Zinser.

Einbauraten von ^{14}C-Thymidin (——), ^{14}C-Uridin (– – –), und ^{14}C-Leucin (- - - -) bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung von:

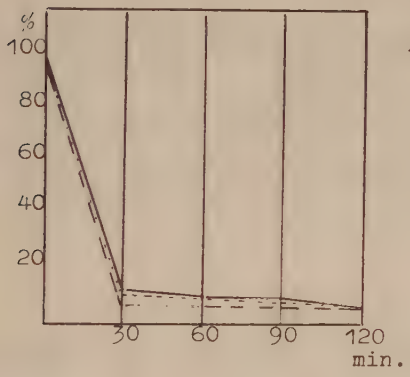
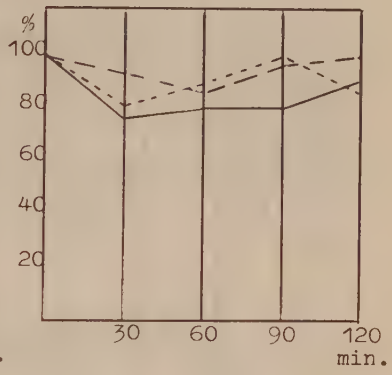


Abb. 10
2-Äthyloctanol-(1)



2-Äthyloctanal-(1)

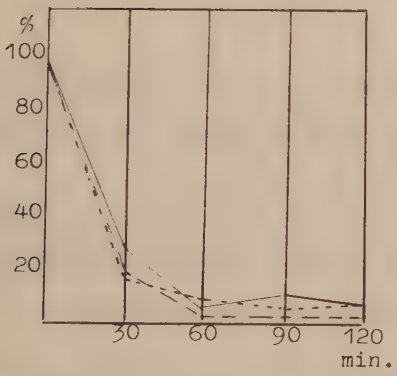
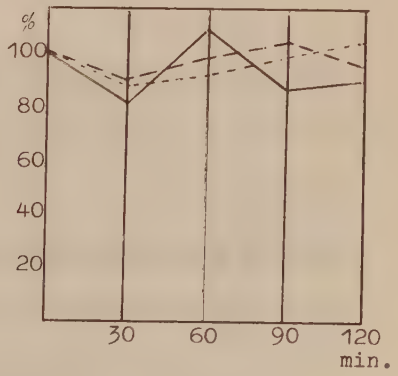
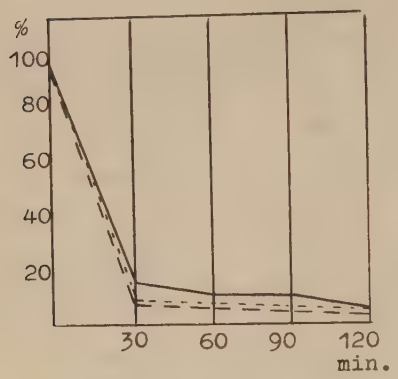


Abb. 11
3-Äthyloctanol-(1)



3-Äthyloctanal-(1)

Einbauraten von ^{14}C-Thymidin (——), ^{14}C-Uridin (– – –) und ^{14}C-Leucin (-----) bei Ascitestumorzellen nach Einwirkung von:



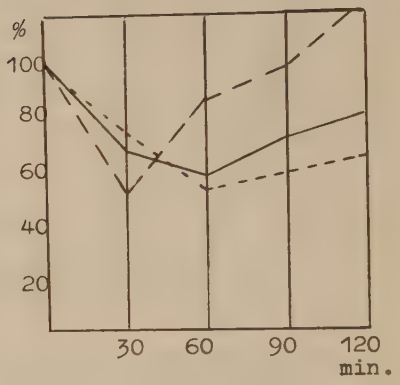


Abb. 12

3-Methyloctanol-(1) 3-Methyloctanal-(1)

Während die Alkohole den Einbau aller drei Metabolite auf etwa 0 - 15 % der Kontrolle senken, zeigen die Aldehyde eine viel schwächere Wirkung in diesem System. Für 4- und 6-Äthyloctanol-(1) und 4- und 6-Äthyloctanal-(1) wurden ähnliche Einbauratenkurven erhalten. Diese Versuchsergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Befunden von R. Jackisch[9)], der zeigte, daß 2n- und 3n-Propyl bzw. Isopropyloctanole die Parameter der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese nach 60 min auf 0 % der Kontrolle senken, die entsprechenden Aldehyde jedoch nur eine Senkung von etwa

80 - 50 % erreichen, obwohl sie in höheren Konzentrationen eingesetzt waren.

Alle in Kap. 2. A. b) beschriebenen β-Diketone und α-β- ungesättigten Ketone zeigten keine Hemmeffekte bezüglich der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese von Ascitestumorzellen. Als Beispiele seien die Kurven der Einbauraten gezeigt für die mit 5-Methyl-2,4-octandion und 5-Methyl-octen-(3)-on-(2) inkubierten Systeme:

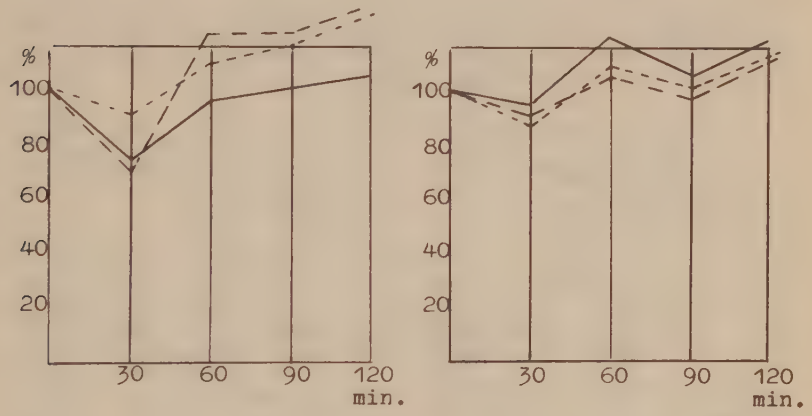


Abb. 13
5-Methyloctandion-(2,4) 5-Methylocten-(3)on-(2)

Thymidin (——), Uridin (– – –), Leucin (- - - -)

Für die in Abschnitt 2. C. beschriebenen Gruppe der Isoxazole wurden interessante Ergebnisse erhalten: Um die wirksame Gesamtkohlenstoffzahl der Alkylsubstitution zu

ermitteln, wurde eine Gruppe symmetrischer Isoxazole geprüft vom einfachen unsubstituierten Ring bis zum 3,5-dibutylsubstituierten Derivat. In Abb. 14 und 15 sind die Versuchsergebnisse dargestellt für die Einbauraten von ^{14}C-Thymidin, ^{14}C-Uridin und ^{14}-Leucin von Ascitestumorzellen nach Einwirkung von Isoxazol 3,5-Dimethylisoxazol, 3,5-Diäthylisoxazol, 3,5-Dipropylisoxazol und 3,5-Dibutylisoxazol:

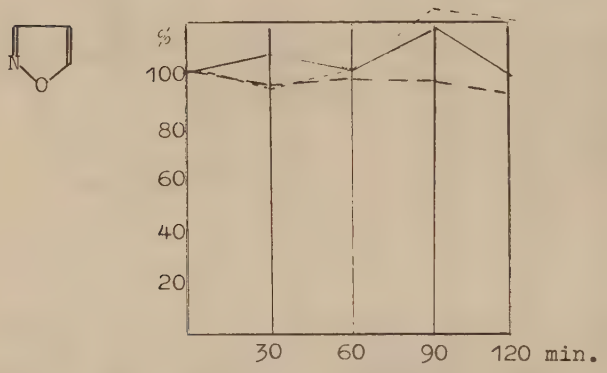
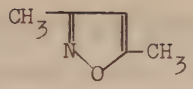
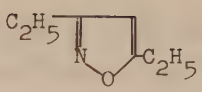
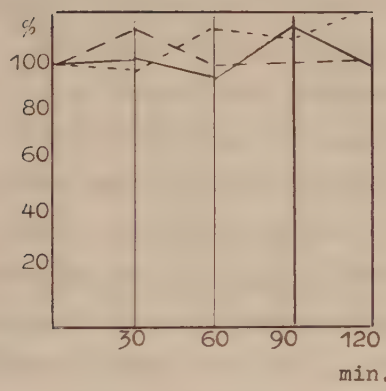


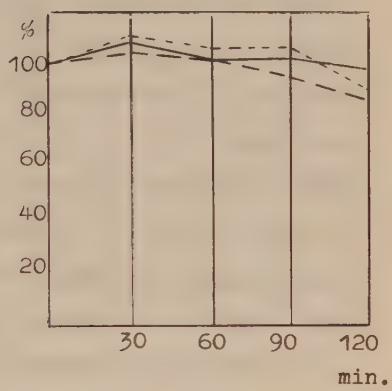
Abb. 14

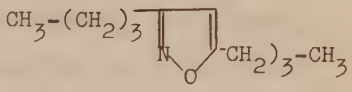
Einbauraten von ^{14}C-Thymidin (——), ^{14}C-Uridin (– – –) und ^{14}C-Leucin (- - - -) für Isoxazol (Konz. $2 \cdot 10^{-4}$).

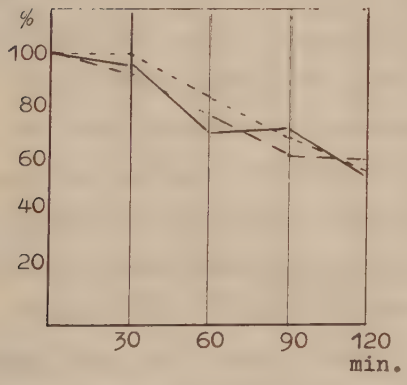












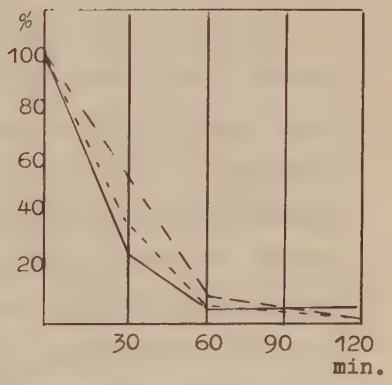


Abb. 15
Einbauraten von ^{14}C-Thymidin (——), ^{14}C-Uridin (– – –) und ^{14}C-Leucin (·---·) für(3,5-Dimethylisoxazol, 3,5-Diäthylisoxazol) 3,5-Dipropylisoxazol und 3,5-Dibutylisoxazol (in der Konz. $2 \cdot 10^{-4}$ m).

Wie aus Abb. 14 und 15 hervorgeht, bewirken die ersten 3 Glieder dieser Reihe von Isoxazolen keine Hemmung der Einbauraten, erst durch die Dialkylsubstitution mit einer Gesamtkohlenstoffzahl von 8 tritt eine deutliche Senkung aller drei Parameter ein. Alle in dieser Arbeit untersuchten 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazole mit einer Gesamtzahl von 8 - 10 C-Atomen der Alkylketten hemmen die DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese stark in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ m. Um zu prüfen, ob strukturbedingte Unterschiede bestehen hinsichtlich der Effekte gegenüber Asciteszellen in vitro, wurden symmetrisch, unsymmetrisch und verzweigt unsymmetrisch 3,5-disubstituierte Isoxazole der C_8-Gesamtalkylkettenlänge miteinander verglichen in einer Konzentration, die an der Grenze der Wirksamkeit liegt, nämlich 10^{-4} molar. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 16 - 17 dargestellt: Es ist zu ersehen, daß die Di-n-butylverbindung wirksamer ist als das Dipentylderivat, möglicherweise liegt das Wirkungsoptimum bei einer Gesamtalkylkettenlänge von 8 C-Atomen, wobei es keine Rolle spielt, ob die Verbindung symmetrisch oder unsymmetrisch, mit dem längeren Alkylrest am C^3 substituiert ist. Durch Einführung einer Verzweigung verschlechtert sich die Wirkung, dies gilt auch für das Isomerenpaar 3-(1'-Methylbutyl)-5-propylisoxazol und 5-(1'-Methylbutyl)-3-propylisoxazol (die hier nicht aufgeführt sind). Die Unterschiede zwischen den 3- und 5- verzweigt alkylsubstituierten Isomeren selbst sind nicht signifikant.

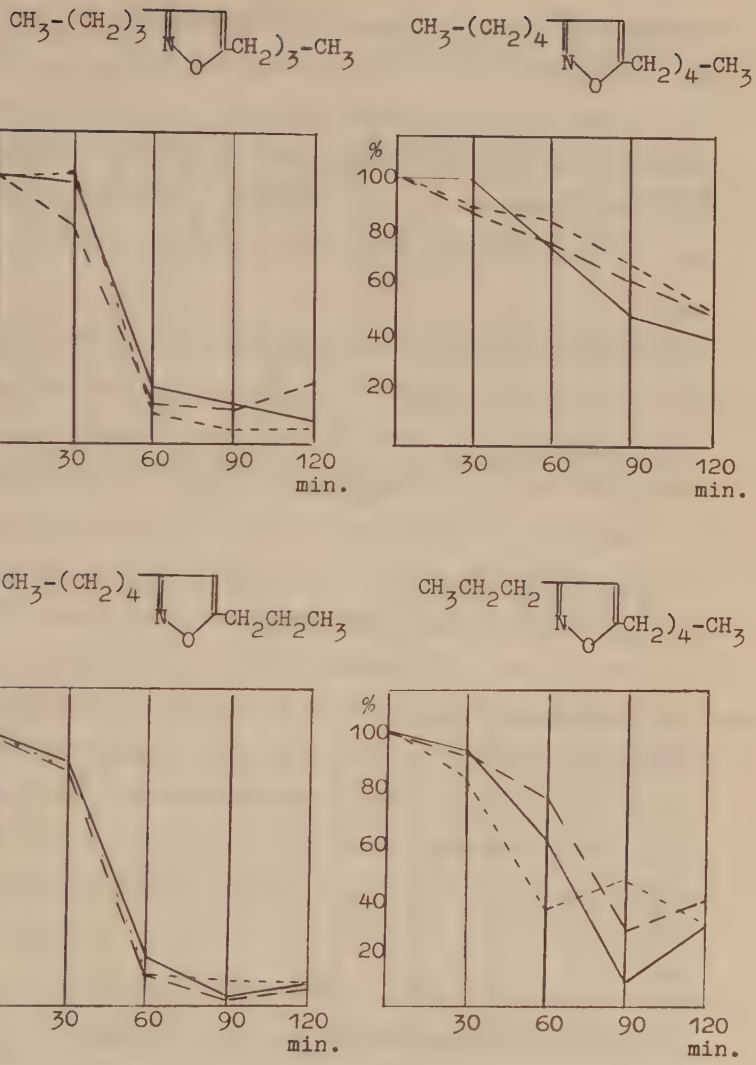
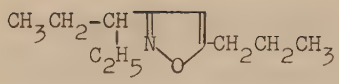
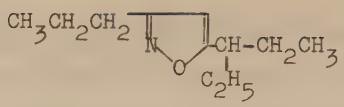
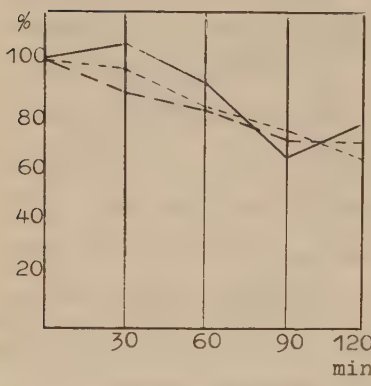


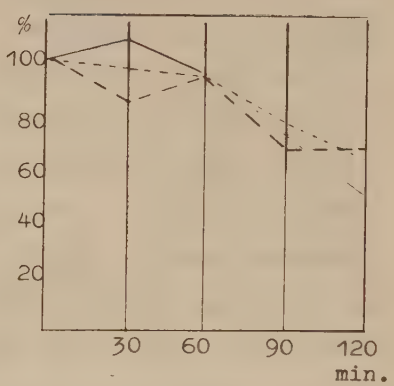
Abb. 16

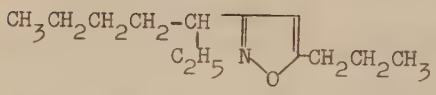
Einbauraten von ^{14}C-Thymidin (——), ^{14}C-Uridin (– – –) und ^{14}C-Leucin (- - - -) für 3,5-Dibutylisoxazol, 3,5-Dipentylisoxazol, 3-Pentyl-5-propylisoxazol und 3-Propyl-5-pentylisoxazol (Konz. 10^{-4} m).











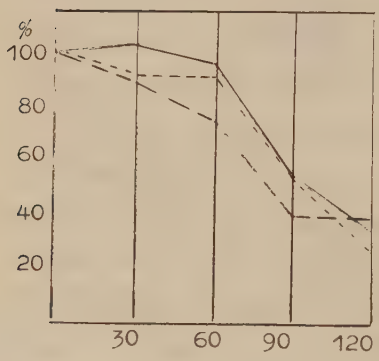


Abb. 17
Einbauraten von ^{14}C-Thymidin (——), ^{14}C-Uridin (– – –) und ^{14}C-Leucin (- - - -) für 3-(1'-äthylpropyl)-5-propyl-isoxazol, 3-Propyl-5-(1'-äthylpropyl)-isoxazol und 3-(1'-äthylpentyl)-5-propylisoxazol (Konz. 10^{-4} m).

Aus der gleichmäßigen Senkung aller 3 Parameter der DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese ist zu ersehen, daß die Asciteszelle nicht in einem bestimmten Stoffwechselweg getroffen wird, sondern in einer mehrere metabolische Routen betreffenden Funktion. Das legt die Vermutung nahe, daß die Membran Angriffsort der Verbindungen ist.

b) Einfluß der Verbindungen auf die Membranpermeabilität

Eine von Weitzel und Mitarb.[57] beschriebene Methode vermittelt Informationen über die Nucleosidpermeation von Asciteszellen, die der Einwirkung eines Cytostatikums ausgesetzt sind: ^{14}C-markierte Metabolite der Nucleinsäurebiosynthese werden der Zelle angeboten; der Einbau in die entsprechende Makromoleküle wird verfolgt wie in den vorangegangenen Experimenten. Gleichzeitig wird jedoch die Menge der Nucleoside, die die Zellmembran passiert haben, aber noch nicht eingebaut sind, bestimmt im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. In diesem Versuch wurden nur einige Substanzen ausgewählt und nur ein Zeitwert gemessen. In Tab. 2 sind die Versuchsergebnisse dargestellt.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist bewirken alle cytostatisch wirksamen Substanzen eine Permeationshemmung der Nucleoside, der Effekt ist jedoch nicht so stark ausgeprägt, ums als alleinige Ursache der Einbauhemmung in Frage zu kommen.

Substanz	Einbauhemmung		Hemmung der Nucleosid-permeation	
	^{14}c-Thymidin	^{14}C-Uridin	^{14}C-Thymidin	^{14}C-Uridin
3,5-Dibutylisoxazol	13 %	2 %	50 %	7 %
3-n-pentyl-5-propyl-isoxazol	15 %	2 %	44 %	4 %
3,5-Dipropylisoxazol	85 %	102 %	108 %	118 %
2-Äthyloctanol-(1)	18 %	8 %	60 %	10 %
2-Äthyloctanal-(1)	40 %	52 %	64 %	56 %

Tab. 2

Einbauhemmung und Nucleosidpermeationshemmung von ^{14}C-Thymidin und ^{14}C-Uridin für 3,5-Dibutylisoxazol, 3-n-pentyl-5-propylisoxazol, 3,5-Dipropylisoxazol, 2-Äthyloctanol-(1) und 2-Äthyloctanal-(1).

Zeit: 120 min

Konz.: $2 \cdot 10^{-4}$ m

Kontrolle = 100 %

B. Einwirkung der Verbindungen auf das Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo

Die Ergebnisse der Versuche am Ehrlich-Ascites-Carcinom in vivo sind für die äthylverzweigten Octanole in Tab. 3 zusammengefaßt:

Substanz	Dosis p. Maus u. Tag i.p. mg	Werte am 11. Versuchstag: Ascitesmenge in % der Kontrolle	überlebende Tiere von 11	davon mit Ascites
2-Äthyloctanol-(1)	4	0	11	0
	3	2	11	1
3-Äthyloctanol-(1)	4	0	11	0
	3	19	11	5
4-Äthyloctanol-(1)	4	4	11	2
	3	10	10	3
5-Äthyloctanol-(1)	4	0	10	0
	3	2	11	2
6-Äthyloctanol-(1)	4	2	11	1
	3	3	11	2
7-Äthyloctanol-(1)	4	4	11	3
	3	11	11	5

Tab. 3 Einwirkung der äthylverzweigten Octanole auf das Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom.

Auf Grund der "in vitro"-Experimente wäre zu erwarten, daß die 2- und 3-substituierten Octanole bessere Ergebnisse liefern als die übrigen Alkohole. In den "in vivo"-Versuchen sind jedoch keine auffälligen Unterschiede in der Wirksamkeit der verschiedenen äthylverzweigten Octanole feststellbar. (Unterschiede von 5 - 8 % liegen innerhalb der Schwankungsbreite der Versuche). Alle Alkohole erwiesen sich in der cytostatisch wirksamen Dosis schon als verhältnismäßig toxisch. Sehr toxisch waren auch alle in Kap. 2. B. aufgeführten aliphatischen Oxoverbindungen. Tab. 4 gibt eine Übersicht der Versuchsergebnisse. Wie erwartet, waren die Aldehyde etwas wirksamer als die β-Diketone und α-β-ungesättigten Ketone, jedoch weniger wirksam als die Alkohole. Ähnliche Ergebnisse lieferten die methylverzweigten Octanole und Octanale, die etwas weniger effektiv waren als die entsprechenden Äthylverbindungen. Die Dosierung richtete sich nach der Toxizität der jeweiligen Substanz, die in einem Vorversuch bestimmt werden mußte. In Abb. 18 und 19 sind die Ergebnisse noch einmal veranschaulicht.

Als sehr wenig toxisch erwiesen sich die 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazole, wenn die Gesamtzahl der C-Atome der beiden Alkylreste 6, 8 oder 10 war. Daher war es möglich, diese Substanzen in hoher Dosierung einzusetzen. Tab. 5 und Abb. 20 und 21 geben einen Überblick über die cytostatische Wirksamkeit dieser Verbindungsklasse. Die ersten beiden Glieder dieser Reihe waren völlig wirkungs-

Tab. 4

Einwirkung von äthylverzweigten 1-Octanalen, β-Diketonen und α-β-ungesättigten Ketonen auf das Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo.

		Werte am 11. Versuchstag		
	Dosis p. Maus u. Tag i.p. mg	Ascites-menge in % der Kontrolle	überle-bende Tiere von 11	davon mit Ascites
2-Äthyloctanal-(1)	2	47	10	10
3-Äthyloctanal-(1)	2	80	11	11
4-Äthyloctanal-(1)	2	10	11	2
6-Äthyloctanal-(1)	2	74	11	11
5-Methyloctan-2,4-dion	5	37	11	5
5,5-Dimethylhexan-2,4-dion	3	113	11	11
Octan-2,4-dion	5	65	11	11
Octen-(3)on-(2)	5	101	11	11
	3	101	11	11
5-Methylocten-(3)on-(2)	5	46	11	9

Tab. 5

Einwirkung von Isoxazol und 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazolen auf das Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo.

Substanz	Dosis p. Maus u. Tag i.p. mg	Werte am 11. Versuchstag: Ascites-menge in % der Kontrolle	überle-bende Tiere von 11	davon mit Ascites
Isoxazol	7	75	11	11
3,5-Dimethylisoxazol	3	94	11	11
3,5-Diäthylisoxazol	3	105	9	9
3,5-Dipropylisoxazol	5	60	11	11
	7	39	11	11
	10	13	11	4
3,5-Dibutylisoxazol	5	25	10	4
	8	4	10	4
3,5-Dipentylisoxazol	5	58	9	9
	6	8	11	3
3-(1'-Äthylpentyl) 5-propylisoxazol	5	20	11	7
	8	0	11	0
3-(1'-Methylbutyl) 5-propylisoxazol	5	8	11	2
	8	2	11	1
5-(1'-Methylbutyl) 3-propylisoxazol	5	2,5	11	2
	8	2	11	2
	10	0	11	0
3-(1'-Äthylpropyl) 5-propylisoxazol	5	6	11	3
5-(1'-Äthylpropyl) 3-propylisoxazol	5	18	11	7
3-n-pentyl-5-propyl-isoxazol	5	9	9	3
5-n-pentyl-3-propyl-isoxazol	5	3	11	2

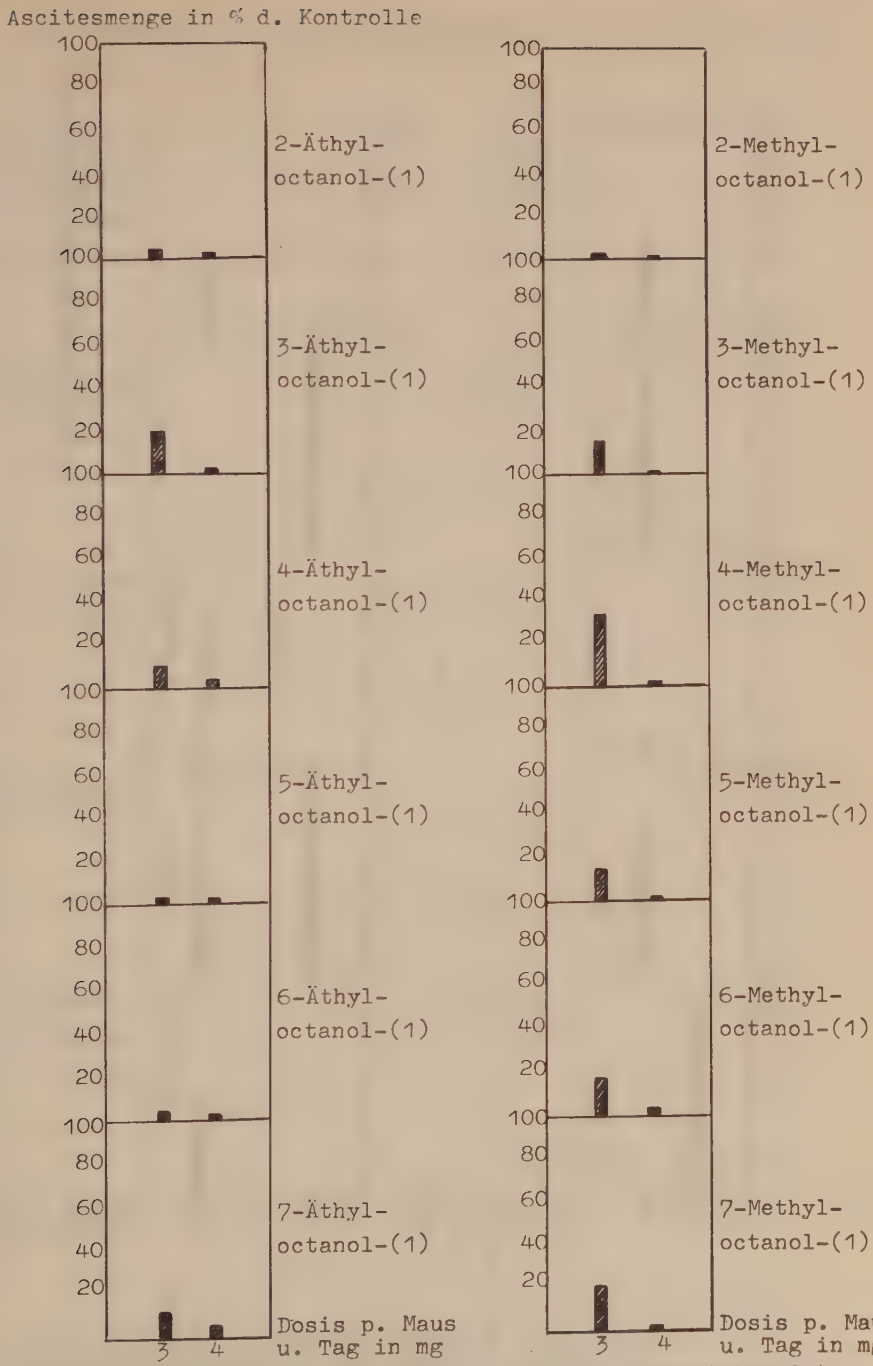


Abb. 18 Einwirkung von äthyl- und methylverzweigten Octanolen auf das Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo.

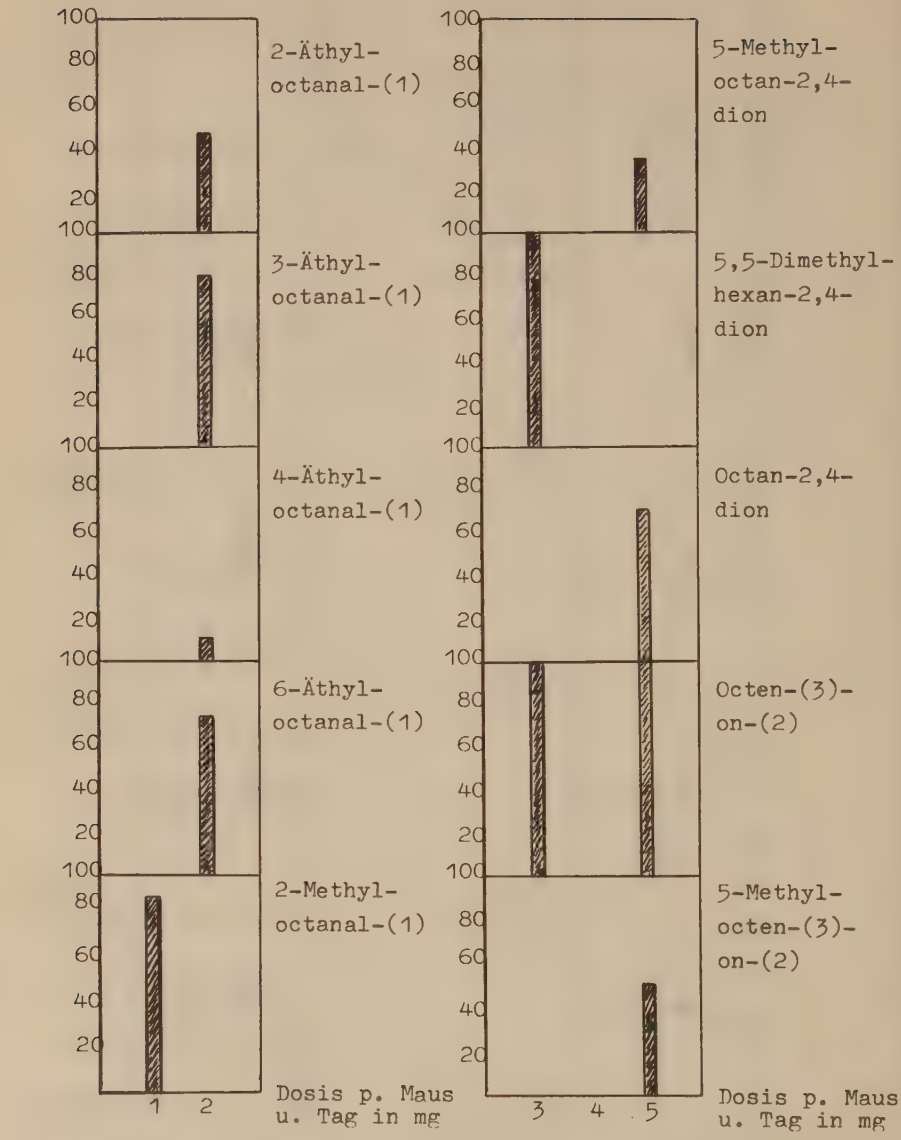


Abb. 19 Einwirkung von äthyl- und methylverzweigten 1-Octanalen, β-Diketonen und α- β-ungesättigten Ketonen auf das Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo.

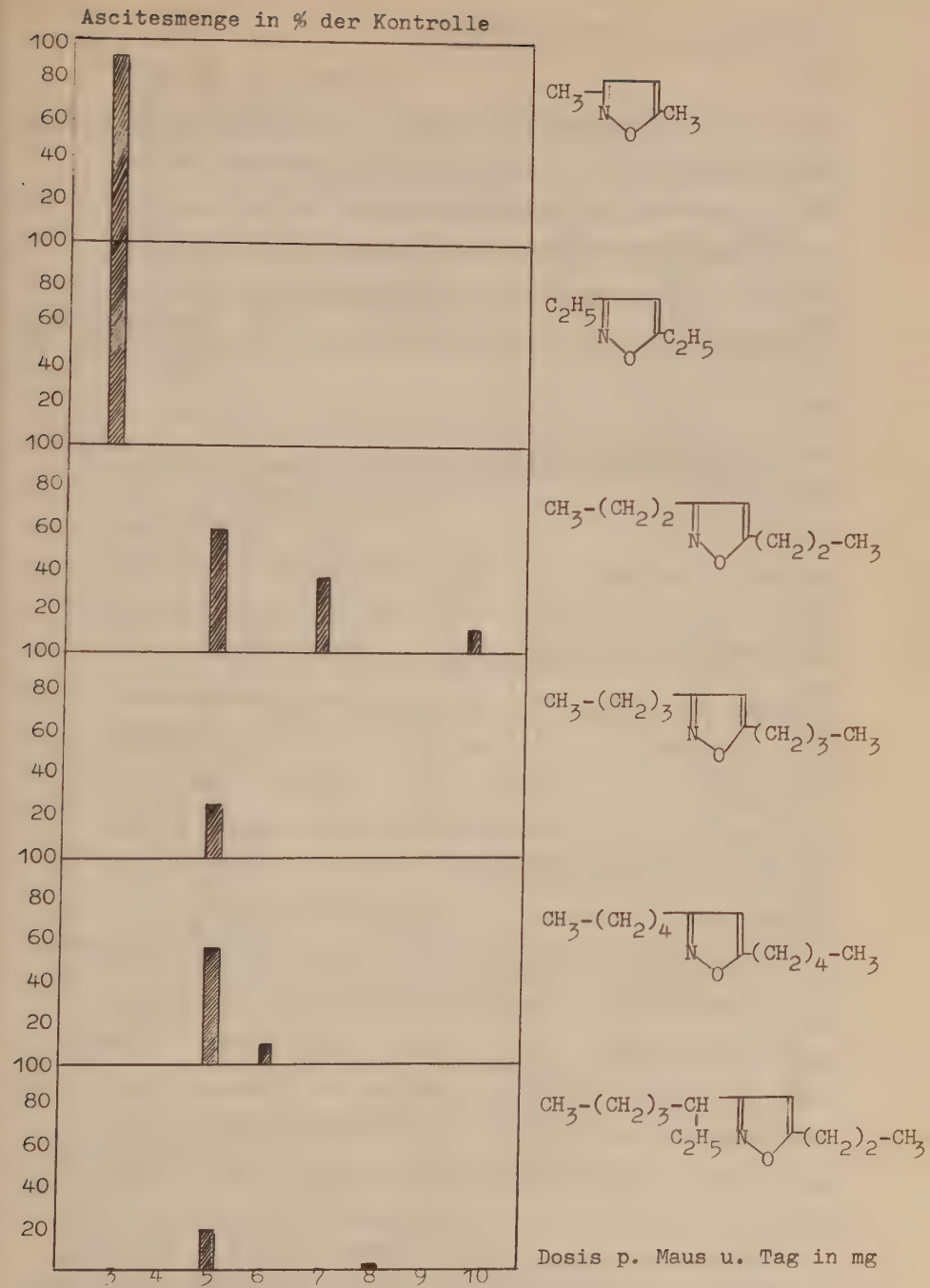
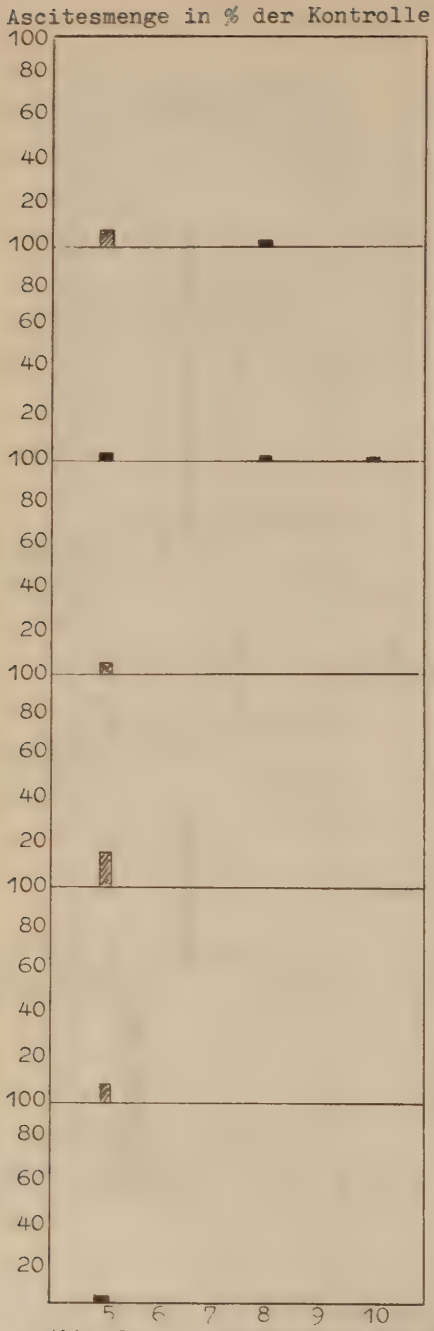


Abb. 20 Einwirkung von 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazolen auf das Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo.



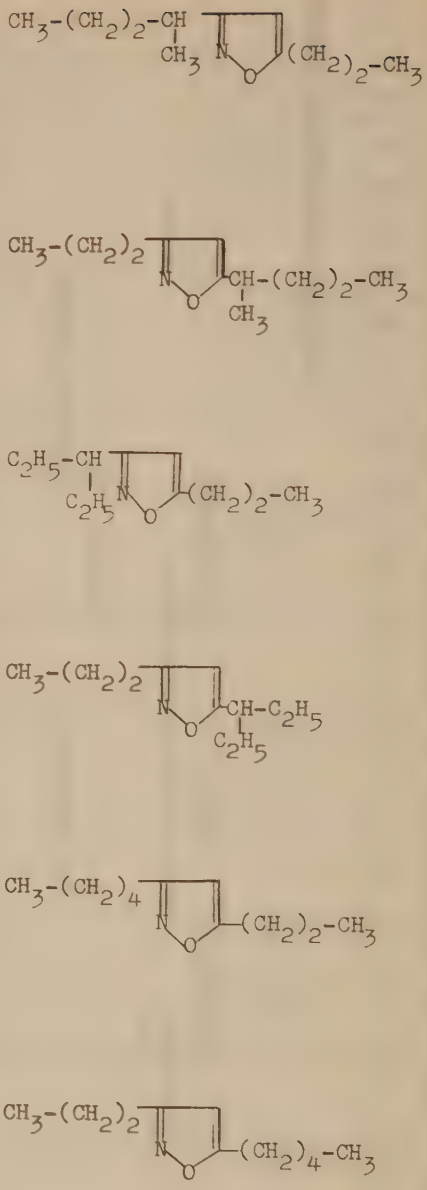


Abb. 21 Einwirkung von 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazolen auf das Mäuse-Ascites-Carcinom in vivo.

los, erst ab einer Gesamtalkylkettenlänge von 6 C-Atomen traten cytostatische Effekte auf. Im großen und ganzen entsprachen die Versuchsergebnisse den Erwartungen, die auf Grund der in vitro Experimente gewonnen wurden. Die Isoxazole mit verzweigten Alkylresten scheinen jedoch am Ganztier wirkungsvoller zu sein als an Asciteszellen in vitro.

C. Einwirkung der Verbindungen auf andere Transplantationstumoren

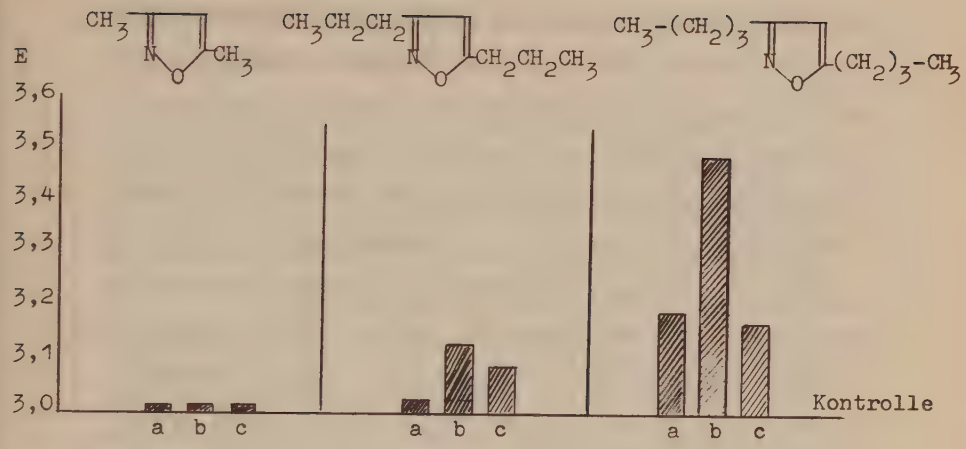
Die äthylverzweigten Octanole und einige der am Mäuse-Ascites-Carcinom wirksamsten 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazole wurden an soliden Rattentumoren (Yoshida - Sarkom und Walker - Carcinomsarkom) auf cytostatische Aktivität geprüft und erwiesen sich als fast wirkungslos (maximale Senkung 65 - 70 % gegenüber der Kontrolle). In der Therapie des Ascites-Carcinoms der Maus werden die Substanzen direkt in den Tumor, in der Therapie solider Tumoren werden sie tumorfern injiziert. Hieraus ergibt sich eine zusätzliche Forderung für die Eignung einer cytostatisch wirksamen Verbindung zur Chemotherapie: Sie muß in ausreichender Menge in ihrer wirksamen Form zum Tumor transportiert werden. Die Gründe für das Versagen der am soliden Yoshida- und Walker-Sarkom getesteten Octanole und Isoxazole liegen wahrscheinlich darin, daß der Transport der Verbindungen im Organismus erschwert

ist, oder aber, daß Transport und enzymatischer Abbau miteinander konkurrieren, so daß die Substanzen großenteils schon in cytostatisch unwirksame Stoffe übergeführt sind, bevor sie den Tumor erreichen.

4. Einwirkung der Verbindungen auf andere biochemische Systeme

A. Beeinflussung der osmotischen Resistenz von Erythrocyten

Um weitere Hinweise für die Membranaktivität der untersuchten Octanole und Isoxazole zu erhalten, wurde der Einfluß dieser Verbindungen auf humane Erythrocyten untersucht. Hierzu wurden die Zellen in einem isotonen Puffer mit den Substanzen in 3 verschiedenen Konzentrationen ($2 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} und $2 \cdot 10^{-3}$ m) behandelt, die Inkubationsdauer betrug 1, 2 und 3 Stunden. Dann wurden die auf diese Weise behandelten Erythrocyten in einen schwach hypotonen Puffer gegeben; die Hämolyse wurde nach 20 Stunden photometrisch gemessen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Gesunde, unbehandelte Erythrocyten hämolysieren in diesem schwach hypotonen Puffer (101,8 m M) noch nicht. In Abb. 22 sind die Ergebnisse für eine Auswahl von Substanzen dargestellt für die Inkubationszeit von 3 Stunden und 3 verschiedenen Konzentrationen:



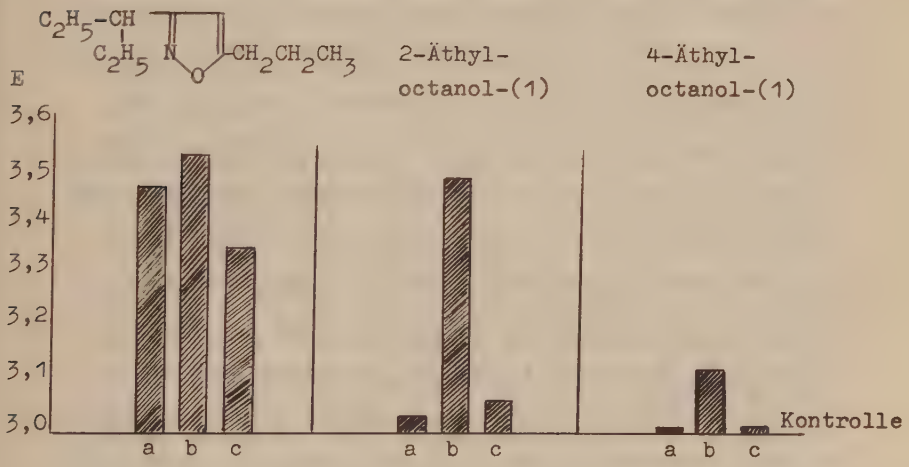


Abb. 22

Einwirkung von verschiedenen 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazolen und äthylverzweigten Octanolen auf Erythrocyten, die einem schwach hypotonen Puffer ausgesetzt sind (101,8 m M). Das Ausmaß der Hämolyse ist an der Extinktion bei 546 m μ abzulesen, die Kontrolle hämolysiert nicht. Die Konzentrationen sind: a = $2 \cdot 10^{-4}$ m, b = 10^{-3} m, c = $2 \cdot 10^{-3}$ m .

Aus Abb. 22 ist deutlich zu ersehen, daß der hämolysierende Effekt der alkylsubstituierten Isoxazole mit der Kohlenstoffzahl der Alkylkette zunimmt und - bei gleicher Kohlenstoffzahl der Kette - am stärksten ist für das unsymmetrisch substituierte Isoxazol mit einem verzweigten Alkylrest. Die 3,5-dimethylsubstituierte Verbindung war völlig wirkungslos, es ergaben sich die Kontrollwerte. Von den Octanolen zeigte 2-Äthyloctanol einen stärkeren Effekt als 4-Äthyloctanol - an den Asciteszellen in vitro war ebenfalls die 2-äthylsubstituierte Verbindung die wirksamste! Auffällig ist die Abhängigkeit des Effekts von der Konzentration, wobei zu beachten ist, daß er nicht mit steigender Konzentration zunimmt, sondern ein Maximum durchläuft. Dieses Phänomen, Erhöhung oder Erniedrigung der osmotischen Resistenz von Erythrocyten je nach der Konzentration der einwirkenden membranaktiven Substanz, wurde schon von mehreren Autoren beschrieben, so beobachtete Ph. Seeman[58)], der die Einwirkung einer homologen Reihe aliphatischer Alkohole auf die Erythrocytenmembran untersuchte, daß bei niedrigen Konzentrationen ein stabilisierender, bei höheren Konzentrationen ein hämolysierender Effekt eintritt, wobei die Membranaktivität innerhalb der homologen Reihe zunahm mit der Länge der Alkylkette.

B. Einwirkung auf die adrenalininduzierte Lipolyse an isolierten Fettzellen

Es ist schon seit einigen Jahren bekannt, daß 3,5-Dimethylisoxazol den Gehalt an freien Fettsäuren im Blut fastender Ratten senkt[59]. Später konnte jedoch in Experimenten an isoliertem Fettgewebe gezeigt werden[44], daß dieser antilipolytische Effekt nicht auf das 3,5-Dimethylisoxazol selbst zurückgeht, sondern auf die 3-Methylisoxazol-5-carbonsäure, die im Organismus aus dem Dimethylisoxazol entsteht. Homologe 3,5-dialkylsubstituierte Isoxazole wurden weder in vivo noch in vitro auf antipolytische Wirksamkeit untersucht.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von 5-(1'-Äthylpropyl)-3-propylisoxazol, eines unsymmetrisch verzweigt substituierten Isoxazols der C_8-Reihe -, auf die adrenalininduzierte Lipolyse an isolierten Fettzellen geprüft. Nach einer Methode von M. Rodbell[60] wurden Teile des Nebenhodenfettgewebes von Ratten zur Gewinnung der Zellen mit Kollagenase in gepuffertem Medium inkubiert, die freigesetzten Zellen wurden sorgfältig isoliert, gewaschen und in Puffer suspendiert. In der auf diese Weise erhaltenen Fettzellensuspension wurde die Lipolyse mit Adrenalin induziert, ein Teil der Proben wurde gleichzeitig mit der zu prüfenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen, ein anderer Teil zur Kontrolle mit Insulin in verschiedenen Dosen versetzt.

Nach einer Inkubationsdauer von 2 Stunden wurden die Zellen abfiltriert und die Konzentration der freien Fettsäuren im Medium bestimmt nach einer Methode von P. Dieterle[61]. Die Fettsäuren werden als Kupfersalze mit Chloroform extrahiert, die Kupferseifen werden mit Diäthyldithiocarbaminat in einen Kupferkomplex überführt und kolorimetrisch bestimmt. In Abb. 23 ist eine Dosis-Wirkungskurve dargestellt für 5-(1'-Äthylpropyl) -3-propylisoxazol verglichen mit der Dosis-Wirkungskurve von Rinderinsulin: Die Verbindung zeigt einen starken dosisabhängigen antilipolytischen Effekt in diesem Testsystem, das in gleichem System getestete 3,5-Dimethylisoxazol besaß, wie erwartet, keinerlei antilipolytische Wirkung.

Hemmung der Lipolyse von 1 γ Adrenalin/ml in %

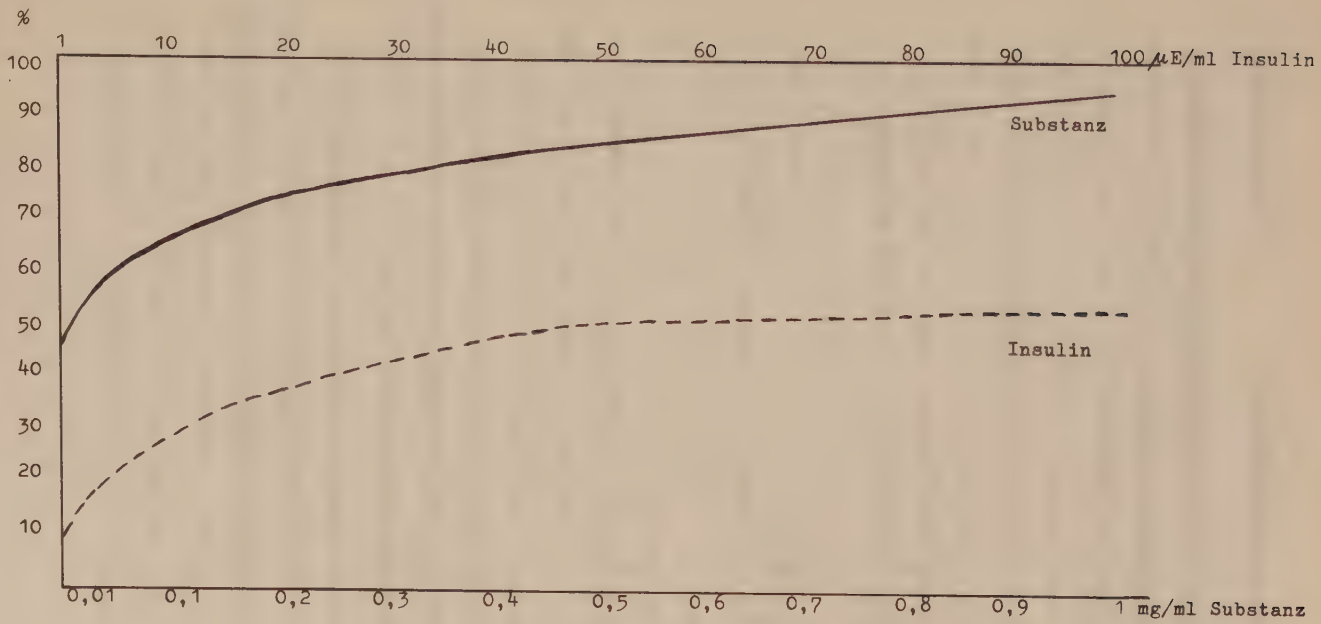
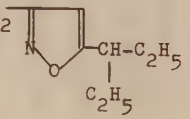


Abb. 23

Einwirkung von $CH_3CH_2CH_2$



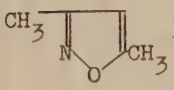
auf die adrenalininduzierte Lipolyse an isolierten Fettzellen im Vergleich zu Insulin.

Ordinate: Hemmung der Lipolyse von 1 γ Adrenalin pro ml in %

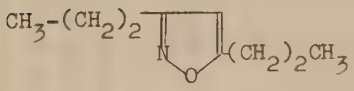
Abszisse: Konzentration von 5-(1'-Äthylpropyl)-3-propyl-isoxazol in mg/ml bzw. Konzentration von Insulin in µE/ml

5. Bestimmung des Dipolmoments

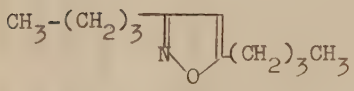
Für eine Reihe von 3,5-dialkylsubstituierte Isoxazole wurde das Dipolmoment bestimmt:



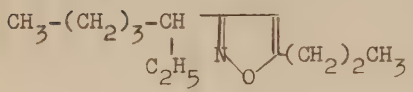
μ = 3,19 Debye



μ = 3,22 Debye



μ = 3,17 Debye



μ = 3,06 Debye

Diese Isoxazole, die in den biologischen Testen eine ganz unterschiedliche Wirksamkeit zeigten, besitzen alle ein fast gleiches Dipolmoment.

Für die in dieser Arbeit beobachtete biologische Wirksamkeit der 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazole scheint somit das Dipolmoment nicht von entscheidender Bedeutung zu sein.

6. Diskussion

Alle vorstehend beschriebenen, cytostatisch wirksamen Substanzen zeigen keinen spezifischen Angriffspunkt in einem die DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese betreffenden System. Man muß vielmehr annehmen, daß die Ascites-zelle in einer diese drei Systeme umfassenden Funktion getroffen wird, so daß DNS-, RNS- und Proteinbiosynthese gleichmäßig zum Erliegen kommen. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Membran Angriffsort der Verbindungen ist. Die Nucleosidpermeation war im Vergleich zur Kontrolle gehemmt, aber der Effekt war nicht stark ausgeprägt, so daß die Permeationshemmung als alleinige Ursache der cytostatischen Wirkung nicht in Frage kommt. Dies spricht jedoch nicht gegen die Annahme der Membranschädigung, denn es könnten noch andere Membranfunktionen oder innere Membranen getroffen sein. In diesen Zusammenhang gehört auch die gefundene Verminderung der osmotischen Resistenz von Erythrocyten, die vermutlich auch durch eine vorangegangene Membranschädigung hervorgerufen wird[62]. Welche Moleküleigenschaften für die Membranschädigung verantwortlich sind - ob es sich - nach A. C. Allison[63] - um oberflächenaktive Verbindungen handelt, oder um Substanzen, die sich in Lipiden lösen und die Struktur verändern - bedarf noch weiterer Untersuchungen. Wahrscheinlich besteht kein direkter Zusammenhang mit dem Dipolmoment, da wirksame und

unwirksame Isoxazole fast das gleiche Dipolmoment besitzen. Ob die antilipolytische Wirkung an isolierten Fettzellen ebenfalls auf Membraneffekten beruht, muß in weiteren Experimenten gesichert werden.

7. Beschreibung der Versuche

A. Allgemeines

Zu den Substanzen:

Alle Ausgangsprodukte für die Synthesen der getesteten Verbindungen wurden von der Firma Th. Schuchardt (München) bezogen.

In der Nomenklatur der Octanole wurde auf Bezeichnung der Chiralität verzichtet, wahrscheinlich wurden Racemate erhalten.

Alle Schmelzpunkte und Siedepunkte sind unkorrigiert angegeben.

Die Analysen wurden von Herrn Dipl. Chem. Robert Glièr, Schweinfurt-Röthlein, und dem analytischen Labor des Physiologisch-chemischen Instituts, unter Leitung von Frau Dr. Anna-Maria Fretzdorff, ausgeführt.

Spektren:

Die IR-Spektren wurden von einem Flüssigkeitsfilm im Modell 21 der Firma Perkin-Elmer angefertigt. Die NMR-Spektren wurden mit dem NMR-Spektrometer A 60 (Varian) in CCl_4 aufgenommen. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im AEI-Massenspektrometer MS 9.

Dipolmoment:

Das Dipolmoment wurde mit dem WTW-Dipolmeter DM 01 bestimmt in benzolischer Lösung, die Auswertung der Messung wurde nach dem Hedestrand-Verfahren[64)] vorgenommen.

Gaschromatographie:

Die Verbindungen wurden mit dem Perkin-Elmer-Fraktometer (Typ 116) mit Helium als Trägergas auf Reinheit geprüft.

B. Synthesen

a) Äthylverzweigte Octanole

2-Äthyloctanol-(1)

2-Äthyl-hexyl-malonsäuredimethylester

Aus gleichen molaren Mengen Na in abs. Methanol, und Malonsäuredimethylester und einem Überschuß von Äthyljodid wird Äthylmalonsäuredimethylester dargestellt. 23 g Na (1 Grammatom) werden in 250 ml abs. Methanol gelöst, zur erkalteten Lösung werden 160 g (1 Mol) Äthylmalonsäuredimethylester gegeben. Unter Rühren werden 185 g (1,1 Mol) 1-Bromhexan zugesetzt und 8 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand in Äther aufgenommen, vom Niederschlag abfiltriert, über Na_2SO_4 getrocknet, der Äther wird abdestilliert und das Produkt über eine Kolonne rektifiziert.
Ausbeute: 168 g (~70% d. Th.) $Kp_{0,3}$: 96-98°

2-Äthyloctansäure

168 g 2-Äthyl-hexyl-malonsäuredimethylester (0,69 Mol) werden mit einem Überschuß KOH verseift und decarboxyliert.
Ausbeute: 88 g (~80% d. Th.) $Kp_{1,5}$: 128-131°

2-Äthyloctanol-(1)

88 g 2-Äthyloctansäure werden mit Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt.

59 g 2-Äthyloctansäurechlorid (0,33 Mol) werden mit 7,5 g Lithiumaluminiumhydrid (0,198 Mol) in Äther reduziert. Nach Entfernung des überschüssigen $LiAlH_4$ wird das Reaktionsprodukt in Äther aufgenommen und destilliert.

Ausbeute: 25 g (65% d. Th.) Kp_{14} : 100-102°

Analyse ber. für $C_{10}H_{22}O$:	gef:
C : 75,88%	C : 75,90%
H : 14,05%	H : 14,00%

3-Äthyloctanol-(1)

3-Bromoctan

Aus 151 g 1-Brompentan (1 Mol), 24,2 g Magnesiumspäne (1 Mol) und 58 g Acetaldehyd (1 Mol) werden über eine Grignardreaktion in etwa 60% Ausbeute 80 g Octanol-(3) erhalten und mit Phosphortribromid in etwa 90% Ausbeute in 3-Bromoctan überführt. Kp_{14}: 75°

3-Äthyloctanol-(1)

Aus 96 g 3-Bromoctan (0,5 Mol) und 12 g Magnesiumspäne (0,5 Mol) wird in 175 ml abs. Äther eine Grignardlösung hergestellt. 22 g Äthylenoxyd (0,5 Mol) werden in einem

Tropftrichter mit Kühlmantel kondensiert und langsam unter Rühren zu der im Eisbad gekühlten Grignardlösung zugetropft (Der zu dieser Reaktion verwendete Tropftrichter war so kalibriert , daß die gewünschte Menge Äthylenoxyd kondensiert werden konnte). Die Temperatur der Reaktionsmischung betrug 10°. Der Ansatz wurde etwa 1 Stunde unter Rühren auf dem Wasserbad erwärmt, dann wurde etwa die Hälfte des Äthers vorsichtig unter Rühren im Wasserstrahlvakuum abgezogen und durch Benzol ersetzt. Unter Normaldruck wurde weiterdestilliert, bis die Temperatur etwa 65° betrug. Der Ansatz wurde noch eine Stunde am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Eiswasser zugesetzt, angesäuert, das Reaktionsprodukt wurde in Äther aufgenommen, die Säure entfernt und die Ätherphase getrocknet. Nach Abziehen des Äthers wurde das Reaktionsprodukt mehrmals über Kolonne destilliert.

Ausbeute: 24 g (etwa 30% d. Th.) Kp_{14}: 104-106°

Analyse ber. für $C_{10}H_{22}O$:	gef:
C : 75,88%	C : 75,90%
H : 14,05%	H : 13,90%

4-Äthyloctanol-(1)

2-Äthyloctanol-(1) wurde mit Phosphortribromid in 1-Brom-2-äthylhexan übergeführt.

Kp_{14}: 83-84°

Aus 24,2 g Magnesiumspänen (1 Mol) und 193 g 1-Brom-2-äthylhexan (1 Mol) wird in 350 ml abs. Äther eine Grignardlösung hergestellt, 44 g Äthylenoxyd zugetropft und der Ansatz aufgearbeitet. Die Ausbeute an 4-Äthyloctanol-(1) betrug 55 g (35% d. Th.)

Kp_{15} : 110°

Analyse ber. für $C_{10}H_{22}O$:	gef :
C : 75,88%	C : 75,98%
H : 14,05%	H : 13,98%

5-Äthyloctanol-(1)

Aus 1-Brompropan und Acetaldehyd wird über eine Grignardreaktion Hexanol-(3) dargestellt und mit Phosphortribromid in 3-Bromhexan überführt.

Kp : 128°

165 g 3-Bromhexan (1 Mol) werden in einer Grignardreaktion mit 44 g Äthylenoxyd (1 Mol) umgesetzt. Die Ausbeute an 3-Äthylhexanol-(1) betrug 43 g (33% d. Th.).

43 g 3-Äthylhexanol-(1) (0,38 Mol) werden mit Phosphortribromid umgesetzt zu 1-Brom-3-äthylhexan.

57 g 1-Brom-3-äthylhexan (0,3 Mol) werden mit 8 g Magnesium (0,3 Mol) und 14,6 g Äthylenoxyd (0,3 Mol) umgesetzt zu 5-Äthyloctanol-(1).

Ausbeute: 15,3 g (29% d. Th.) Kp_{15} : 106°

Analyse ber. für $C_{10}H_{22}O$:	gef :
C : 75,88%	C : 76,05%
H : 14,05%	H : 13,96%

6-Äthyloctanol-(1)

Aus 2-Äthylbutanol-(1) wird mit Phosphortribromid 1-Brom-2-äthylbutan gewonnen.

Aus 165 g 1-Brom-2-äthylbutan (1 Mol), 24,2 g Magnesium (1 Mol) und 44 g Äthylenoxyd (1 Mol) werden 45 g 4-Äthylhexanol-(1) (35% d. Th.) dargestellt und mit Phosphortribromid umgesetzt zu 1-Brom-4-äthylhexan.

Aus 57 g 1-Brom-4-äthylhexan (0,3 Mol), 8 g Magnesium (0,3 Mol) und 14,6 g Äthylenoxyd (0,3 Mol) werden 13,3 g (25% d. Th.) 6-Äthyloctanol-(1) gewonnen.

Kp_{16} : 115°

Analyse ber. für $C_{10}H_{22}O$:	gef :
C : 75,88%	C : 76,20%
H : 14,05%	H : 14,05%

7-Äthyloctanol-(1)

Aus 2-Äthylpropanol-(1) wird mit Phosphortribromid 1-Brom-2-äthylpropan hergestellt.

302 g 1-Brom-2-äthylpropan (2 Mol) werden mit 88 g Äthylenoxyd (2 Mol) in einer Grignardreaktion umgesetzt zu 4-Äthylpentanol-(1), das mit Phosphortribromid übergeführt wird zu 1-Brom-4-äthylpentan.

Aus 120 g 1-Brom-4-äthylpentan (0,67 Mol) und 39,5 g Äthylenoxyd (0,67 Mol) werden 33 g 6-Äthylheptanol-(1) (35% d. Th.) gewonnen und in Bromid überführt.

Aus 47 g 1-Brom-6-äthylheptan (0,227 Mol) und 5,5 g Magnesium (0,227 Mol) wird in Äther eine Grignardlösung hergestellt und im Eiskochsalzbad gekühlt. In diese Lösung wird Formaldehyd eingeleitet, der durch Erhitzen von Trioxan auf 180° gewonnen wird. Nach Beendigung der Reaktion wird am Rückfluß erhitzt. Die Aufarbeitung des Ansatzes ergab 15,2 g 7-Äthyloctanol-(1) (40% d. Th.).

Kp_{16} : 113-114°

Analyse ber. für $C_{10}H_{22}O$:	gef :
C : 75,88%	C : 75,90%
H : 14,05%	H : 13,95%

b) Äthylverzweigte Octanale

2-Äthyloctanal-(1) und 3-Äthyloctanal-(1)

Beide Aldehyde wurden aus den entsprechenden Carbonsäuren, die über Malonestersynthesen erhalten werden, nach dem Verfahren von H.A. Staab und Mitarb.[25] über die Reduktion der Carbonsäureimidazolide dargestellt.

Zu 32,4 g N,N'-Carbonyldiimidazol in 500 ml abs. Äther werden 34,4 g der Carbonsäure (0,2 Mol) gegeben und gerührt, bis eine klare Lösung entsteht. Das entstandene CO_2 wird im Vakuum abgezogen. Unter Kühlung werden 5,2 g $LiAlH_4$ in Äther langsam zugetropft. Nach beendeter Reaktion wird mit Eiswasser hydrolysiert, mit verdünnter Säure angesäuert, das Reaktionsprodukt wird in Äther auf-

genommen. Die Ätherauszüge werden gewaschen und getrocknet, nach Abziehen des Äthers wird der Rückstand unter Stickstoff destilliert.

Ausbeute an Aldehyd : 9-10 g (30-35% d. Th.)

2-Äthyloctanal-(1): Kp_{14} : 92-93°

Analyse für DNPH : ber : 16,65% N gef : 16,84% N

3-Äthyloctanal-(1) : Kp_{12} : 89-90°

Analyse für DNPH : ber : 16,65% N gef : 16,57% N

4-Äthyloctanal-(1) und 6-Äthyloctanal-(1)

Diese beiden Aldehyde wurden durch katalytische Dehydrierung der entsprechenden Alkohole in der Gasphase gewonnen. Zur Herstellung des Katalysators werden Bimssteinkörner in eine Lösung von Silbernitrat gegeben und das Silber ausgefällt durch Zugabe von Formaldehyd und KOH. Das Gemenge aus Bimsstein und Silber wird mit destilliertem Wasser gewaschen, bei 200° getrocknet und in das 50 cm lange Kontaktrohr der Dehydrierungsapparatur[26] eingefüllt. Es ist wichtig, daß das Katalysatormaterial grob ist und locker eingefüllt wird, damit die Produkte nicht zu lange mit dem Kontakt in Berührung kommen, da sonst Zersetzung eintritt und der Kontakt durch Verteerung inaktiviert wird. Die Reaktion wird im Wasserstrahlvakuum durchgeführt, die Temperatur des Kontaktes beträgt etwa 300°. Das

Reaktionsprodukt muß anschließend mehrmals destilliert werden zur Entfernung von Alkohol. Die Ausbeuten sind ziemlich niedrig, da die Apparatur für größere Alkoholmengen gedacht ist.

Ausbeute : 10-20%

4-Äthyloctanal-(1) : Kp_{14} : 90-91°

Analyse für DNPH : ber : 16,65% N gef : 16,65% N

6-Äthyloctanal-(1) : Kp_{12} : 87-89°

Analyse für DNPH : ber : 16,65% N gef : 16,97% N

c) α-β ungesättigte Ketone

Octen-(3)-on-(2)[30] wurde nach dem Verfahren von L. Claisen dargestellt:

174 g Aceton (3 Mol) werden auf -12° gekühlt, 10 g KCN in 20 ml H_2O zugefügt und unter Rühren bei -12° bis -5° 86 g Valeraldehyd zugegeben. Der Ansatz wird 7-8 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Das Reaktionsprodukt wird in Äther aufgenommen, nach Abdestillieren des Äthers wird das Rohprodukt mit etwa der gleichen Menge Acetanhydrid einige Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes werden 50-63 g Octen-(3)-on-(2) (40-50% d. Th.) erhalten.

$Kp_{0,8}$: 50-52°

5-Methylocten-(3)-on-(2)[31] wurde in ähnlicher Weise aus 2-Methyl-n-valeraldehyd und Aceton dargestellt.

$Kp_{0,6}$: 49°

d) β-Diketone

Alle Diketone wurden über eine Claisen-Kondensation dargestellt: 0,5 Mol Na werden in siedendem trockenem Xylol zerstäubt und mit 0,5 Mol abs. Alkohol ins Alkoholat überführt. Unter Kühlung werden 0,5 Mol Keton und 1 Mol Ester langsam zugesetzt und anschließend 4 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Der Ansatz wird mit Wasser aufgenommen, 0,6 Mol Essigsäure zugesetzt und in eine ammoniakalische Kupferacetatlösung gegeben. Nach einigen Stunden wird das Kupfersalz abfiltriert, mit verdünnter Säure zersetzt, das Diketon in Äther aufgenommen und nach Abziehen des Äthers destilliert.

Ausbeute : 40-60% d. Th.

Auf diese Weise wurden erhalten:

Octan-2,4-dion[27] aus Methylbutylketon und Essigester.

Kp_{13} : 82°

5-Methyloctan-2,4-dion[29]:

Aus 2-Brompentan wurde mit Acetaldehyd über eine Grignardreaktion 3-Methylhexanol-(2) hergestellt, mit Kaliumdi-

chromat zum Keton oxydiert. Das Keton wird mit Essigester umgesetzt zum Diketon.

Kp_{12} : 75°

5,5-Dimethylhexan-2,4-dion[28] aus

Kp : 170-171°

e) Isoxazole

Symmetrisch 3,5-dialkylsubstituierte Isoxazole

Alle symmetrischen Isoxazole werden aus den entsprechenden Diketonen, die über eine Claisen-Kondensation aus Keton und Ester gewonnen wurden, dargestellt: Aus dem Kupfersalz wurde das Diketon mit verdünnter Säure in Freiheit gesetzt, in Äther aufgenommen und nach Entfernen des Äthers in Eisessig gelöst. Ein kleiner Überschuß Hydroxylaminhydrochlorid wurde zugesetzt und 1-2 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung mit Natronlauge alkalisch gemacht, das Isoxazol in Äther aufgenommen und nach Abziehen des Äthers destilliert.
Die Ausbeuten betrugen 70-80%.

So wurden erhalten:
3,5-Dimethylisoxazol[45] aus Acetylaceton
Kp : 137°

3,5-Diäthylisoxazol[46] aus Heptan-3,5-dion
Kp_{14} : 60-63°

3,5-Dipropylisoxazol aus Nonan-4,6-dion

$Kp_{0,5}$: 58-60°

Analyse	ber :	gef :
	C : 70,54%	C : 70,58%
	H : 9,86%	H : 9,94%
	N : 9,14%	N : 9,16%

3,5-Dibutylisoxazol aus Undecan-5,7-dion

$Kp_{0,08}$: 52°

Analyse	ber :	gef :
	C : 72,88%	C : 72,80%
	H : 10,56%	H : 10,53%
	N : 7,72%	N : 7,75%

3,5-Dipentylisoxazol aus Tridecan-6,8-dion

$Kp_{0,2}$: 80°

Analyse	ber :	gef :
	C : 74,59%	C : 74,23%
	H : 11,07%	H : 10,95%
	N : 6,69%	N : 6,15%

Unsymmetrisch 3,5-dialkylsubstituierte Isoxazole

11,5 g Natrium (0,5 Mol) werden in 200-250 ml abs. Äther in Form eines feinen Drahtes gepreßt, dazu werden 34 g

1-Pentin (0,5 Mol) zugegeben und geschüttelt, bis alles Na umgesetzt ist, gegebenenfalls wird ein kleiner Überschuß an Pentin verwendet. Das entstandene Na-Acetylid wird vorsichtig unter Rühren mit einer Lösung eines Säurechlorids in abs. Äther versetzt. Nach beendeter Reaktion werden der Äther und überschüssiges Säurechlorid im Vakuum abdestilliert.

Das rohe Acetylenketon wird sofort in Methanol mit einem kleinen Überschuß Hydroxylaminhydrochlorid erhitzt und umgesetzt zum Isoxazol. Die Aufarbeitung ergibt eine Ausbeute von 25-30% d. Th. (bezogen auf Pentin) an Rohprodukt. Dieses kann an einer Aluminiumoxydsäule mit Petroläther und Benzol als Laufmittel vorgereinigt werden und wird dann mehrfach destilliert. Auf diese Weise wurden erhalten:

3-(1'-Methylbutyl)-5-propylisoxazol aus Pentin und 2-Methylvaleriansäurechlorid.

$Kp_{0,4}$: 53°

Analyse	ber :	gef :
	C : 72,88%	C : 72,95%
	H : 10,56%	H : 10,53%
	N : 7,72%	N : 7,57%

3-(1'-Äthylpropyl)-5-propylisoxazol aus Pentin und 2-Äthylbuttersäurechlorid.

$Kp_{0,2}$: 45°

Analyse	ber :	gef :
	C : 72,88%	C : 72,70%
	H : 10,56%	H : 10,55%
	N : 7,72%	N : 7,60%

3-(1'-Äthylpentyl)-5-propylisoxazol aus Pentin und 2-Äthylhexansäurechlorid.

$Kp_{0,2}$: 77°

Analyse	ber :	gef :
	C : 74,59%	C : 74,91%
	H : 11,07%	H : 11,47%
	N : 6,69%	N : 6,91%

3-n-Pentyl-5-propylisoxazol aus Pentin und Hexansäurechlorid.

$Kp_{0,2}$: 63-65°

Analyse	ber :	gef :
	C : 72,88%	C : 72,78%
	H : 10,56%	H : 10,61%
	N : 7,72%	N : 7,68%

Wird das Acetylenketon (1 Mol) mit 1,2 Mol Hydroxylaminhydrochlorid und 1,5 Mol Soda in Methanol erhitzt, so entstehen die isomeren Isoxazole. So wurden erhalten:

5-(1'-Methylbutyl)-3-propylisoxazol

$Kp_{0,1}$: 50°

Analyse	ber :	gef :
	C : 72,88%	C : 72,70%
	H : 10,56%	H : 10,48%
	N : 7,72%	N : 7,57%

5-(1'-Äthylpropyl)-3-propylisoxazol

$Kp_{0,2}$: 45-46°

Analyse	ber :	gef :
	C : 72,88%	C : 72,62%
	H : 10,56%	H : 10,56%
	N : 7,72%	N : 7,69%

5-n-Pentyl-3-propylisoxazol

$Kp_{0,2}$: 63-65°

Analyse	ber :	gef :
	C : 72,88%	C : 72,76%
	H : 10,56%	H : 10,48%
	N : 7,72%	N : 7,66%

C. Biochemische Versuche

a) Einbauversuche mit radioaktiv markierten Metaboliten

Die Bestimmung der Einbauraten von ^{14}C-Thymidin, ^{14}C-Uridin und ^{14}C-Leucin in Asciteszellen, die unter der Einwirkung cytostatisch wirksamer Substanzen stehen, wurde durchgeführt nach einer von Weitzel und Mitarb.[57] beschriebenen Methode. Flüssige Verbindungen werden mit einer Mikrosyringe unmittelbar ins Inkubationsgefäß gegeben, dieses muß sofort verschlossen werden und wird während des Versuchs verschlossen, um Verflüchtigung der Substanzen zu vermeiden.

Zur Bestimmung der Metabolitpermeation[58] werden die Zellen nach 120minütiger Inkubation mit eiskalter Ringer-Lösung zweimal gewaschen. Der nach der Zentrifugation zurückbleibende Zellrückstand wird mit 1 ml 5%iger Trichloressigsäure aufgewirbelt, 30 min im Eisbad belassen und hochtourig abzentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes werden in 15 ml Dioxan-Scintillator[65] pipettiert und die Aktivität im Packard Tri-Carb (Modell 3003) gemessen zur Bestimmung der Nucleosidpermeation. Zur Ermittlung der Einbauraten im gleichen Versuch wird der beim Zentrifugieren zurückgebliebene Rückstand nach Abgießen des säurelöslichen Überstandes verwendet wie früher[57] beschrieben.

b) Versuche an Tumortieren

Die Ganztierversuche am Ehrlich-Ascites-Tumor der Maus und an soliden Tumoren der Ratte werden nach einer Methode von Weitzel und Mitarb.[66,67] durchgeführt. Flüssige wasserunlösliche Substanzen werden als Emulsion injiziert. Hierzu wurden die Verbindungen mit 2 - 3 Tropfen "Prästabit-Öl V" (Chem. Fabrik Stockhausen und Cie., Krefeld) in Ringer-Lösung gegeben und einer Ultraschallbehandlung unterzogen.

c) Versuche mit Erythrocyten

1 ml heparinisiertes Blut aus der Armvene wird zur Abtrennung des Blutplasmas zentrifugiert, mit Puffer (154 m Mol NaCl in 10 m molarem Natriumphosphatpuffer, pH 7) gewaschen und in 11,5 ml des gleichen Puffers suspendiert. (Zellzahl $4 \cdot 10^8$ Zellen pro ml). 0,2 ml der Erythrocytensuspension werden in 3 ml Puffer (164 m Mol) mit den Substanzen inkubiert, die mit einer Mikrosyringe ins Inkubationsgefäß gegeben wurden, so daß ihre Konzentration $2 \cdot 10^{-4}$ m, 10^{-3} m und $2 \cdot 10^{-3}$ m war. In Abständen von 1, 2 und 3 Stunden wurden aus jedem Inkubationsgefäß 0,3 ml Erythrocytensuspension in 3 ml eines schwach hypotonen

---

Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche mit radioaktiv markierten Substanzen danke ich den Herren Dr. R. Jackisch und Dr. A. Jung vom Isotopenlabor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Tübingen.

Puffers (96,5 m molar) gegeben, so daß die Konzentration insgesamt 101,8 m M betrug. Nach 20 Stunden wurde die Hämolyse photometrisch gemessen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle, die nicht hämolysiert war.

d) Fettzellentest

Die Isolierung der Fettzellen erfolgte nach der Methode von M. Rodbell[60], das Nebenhodenfettgewebe wurde jedoch, in Abwandlung dieses Verfahrens, mit Kollagenase in Tris-Puffer, pH 7,8, nach Heptner und Christ[68] mit 3,5 g % Humanalbuminzusatz und 10 mg % Glucose nach Glièman[69] eine Stunde lang bei 37° inkubiert. Die Zellen werden vom Bindegewebe befreit, gewaschen und im Puffer (pH 7,2) suspendiert, so daß ihre Konzentration $5 \cdot 10^{+6}$ Zellen pro ml beträgt. Die Zellen werden dann mit der Substanz in der Konzentration 1, 0,5, 0,1, 0,05 und 0,01 mg pro ml und 1 γ Adrenalin 2 Stunden bei 37° inkubiert. Nach 2 Stunden werden die Proben im Eisbad abgekühlt und die Zellen abfiltriert. 0,5 ml des zellfreien Mediums werden zur Bestimmung der freien Fettsäuren nach Dieterle[61] verwandt. Die Extinktionswerte wurden auf eine Eichkurve mit Stearinsäure bezogen.

Frau Eva Hofman vom Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen danke ich für die Durchführung der Versuche an Tumortieren.

Für die Ausführung des Fettzelltests danke ich Fräulein U. Buss und Herrn Dr. R. Renner vom Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen.

8. Zusammenfassung

Sämtliche DL-Äthyl-octanole, einige äthylverzweigte Octanale, aliphatische α-β-ungesättigte Ketone und β-Diketone der C_8-Kettenlänge und eine Reihe von 3,5-dialkylsubstituierte Isoxazole wurden dargestellt. Ihre Wirkung auf verschiedene biochemische Systeme wurde unter cytostatischen Gesichtspunkten untersucht.

Die Aldehyde zeigten nur schwache cytostatische Aktivität, Ketone und Diketone waren wirkungslos. Die äthylverzweigten Octanole und die 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazole mit einer Gesamtalkylkettenlänge von 8 - 10 C-Atomen erwiesen sich dagegen als cytostatisch stark wirksam gegenüber Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in vitro und dem Ehrlich-Ascites-Carcinom der Maus in vivo. Sie beeinflußten jedoch nicht das Wachstum solider Tumoren der Ratte. Von den alkylverzweigten Octanolen war die in 2-Stellung substituierte Verbindung, in der Reihe der Isoxazole waren die unverzweigten Glieder mit einer Gesamtalkylkettenlänge von 8 C-Atomen die wirksamsten in den Versuchen mit isolierten Tumorzellen. In den in vivo-Experimenten traten diese Unterschiede nicht hervor.

Einige Befunde - die Hemmung der Nucleosidpermeation an Asciteszellen und die Veränderung der osmotischen Resistenz von Erythrocyten unter dem Einfluß der

cytostatisch wirksamen Octanole und Isoxazole - lassen vermuten, daß die Membran Angriffsort der Verbindungen ist. Eines der 3,5-dialkylsubstituierten Isoxazole der C_8-Reihe wurde in einem Test mit isolierten Fettzellen, die der adrenalininduzierten Lipolyse unterlagen, geprüft und bewies eine starke antilipolytische Wirksamkeit.

9. Literaturverzeichnis

1. G. Weitzel und Mitarb.: unveröffentlicht
2. J.H. Burchenal,
   Cancer Research 29, 2262 (1969)
3. H.G. Mandel, D.P. Rall,
   Cancer Research 29, 2478 (1969)
4. G.F. Gause,
   Microbial models of cancer cells. North Holland Publ. C. Amsterdam 1966
5. K.E. Hellstrom u. G. Moller,
   Progr. Allergy 9, 158-245 (1965)
6. G.M.W. Cook u. W. Jacobson,
   Biochem. J. 107, 549-557 (1968)
7. H. Rubin,
   Symp. Soc. Develop. Biol. 25, 315 (1966)
8. D.P.H. Wallach,
   Proc. nat. Acad. Sci. USA 61, 868 (1968)
9. R. Jakisch,
   Dissertation Tübingen 1970
10. G. Weitzel, A.M. Fretzdorff, S. Heller, E. Graeser,
    Kolloid - Z. 127, 110 (1952)
11. R.T. Williams,
    Biochem J. 53, 129 (1953)
12. H. Welch u. G.G. Slocum,
    J. Lab. clin. Med 28, 1440 (1943)
13. J. Ferguson,
    Proc. Roy. Soc. Ser. B., 127, 387 (1939)
14. H.P. Rang,
    Brit. J. pharmacol. 15, 185 (1960)
15. F. Brink u. J.M. Posternak,
    J. cell. comparat. Physiol. 32, 211 (1948)
16. L.J. Mullins,
    Chem. Reviews 54, 289 (1954)
17. J.A. Clements u. K.M. Wilson,
    Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1008 (1962)
18. P.A. Levene u. R.E. Marker,
    J. biol. Chem. 91, 702 (1931)
19. W. Keil,
    Z. physiol. Chem. 274, 180 (1942)
20. F.S. Prout,
    J. org. Chem. 14, 132 (1949)
21. C.V. Wilson,
    J. Am. Chem. Soc. 67, 2161 (1945)

22. L.C. Strong,
Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N.Y.) 30, 386 (1932)

23. E. Boyland u. E.H. Mawson,
Biochem. J. 32, 1982 (1938)

24. E. Boyland,
Biochem. J. 34, 1196 (1940)

25. H.A. Staab et al.,
Ann. 654, 119 (1962)

26. Houben-Weyl, Band VII, Teil 1 (1954)

27. C.D. Hurd et al.,
J. Am. Chem. Soc. 62, 2186 (1940)

28. R. Adams et al.,
J. Am. Chem. Soc. 66, 1222 (1944)

29. H. Adkins et al.,
J. Am. Chem. Soc. 52, 4042 (1930)

30. R. Adams et al.,
J. Am. Chem. Soc. 62, 2206 (1940)

31. K. Loewenberg u. K. Smegkal,
I.G. Farbenind. A.P. U.S. 2200 (1937)

32. H. Adkins,
J. Am. Chem. Soc. 56, 2666 (1934)

33. L. Claisen,
Ann. 306, 326 (1899)

34. L. Claisen,
Chem. Ber. 25, 3166 (1892)

35. L. Vetulani et al.
Hig. med. Dosw. 22, 315 (1968)

36. A. Quilico in
"The Chemistry of Heterocyclic Compounds"
ed. A. Weissberger, Interscience, New York, 1962, S. 223

37. Gagneux et al.
Swiss. 443, 302, 15. Feb. 1968, Appl. 6. Nov. 1964
Referat: C.A. 69, 67367 t (1968)

38. Gagneux et al.
Swiss. 443, 301, 15. Feb. 1968, Appl. 6. Nov. 1964
Referat: C.A. 69, 106697 x (1968)

39. Gagneux et al.
Swiss. 443, 300, 15. Feb. 1968, Appl. 6. Nov. 1964
Referat: C.A. 69, 106698 y (1968)

40. W.E. Dulin und G.C. Gerritsen,
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 121, 777 (1966)

41. P. Bubenheimer, A. Hasselblatt und U. Schwabe,
Klin. Wochenschrift 43, 713 (1966)

42. W.E. Dulin, G.H. Lund und G.C. Gerritsen,
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 118, 499 (1965)

43. W.E. Dulin und G.C. Gerritsen,
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 113, 683 (1963)

44. J.N. Pereira und G.F. Holland,
Experientia 23, 905 (1967)

45. W. Zedel,
Chem. Ber. 21, 2178 (1888)

46. J. Morgan,
J. chem. Soc. 125, 748 (1925)

47. A. Quilico in
"The Chemistry of Heterocyclic Compounds"
ed. A. Weissberger, Interscience, New York, 1962, S. 9

48. C. Moureu,
Compt. rend. 137, 795 (1903)

49. C. Weygand et al.,
Ann. 459, 123 (1927)

50. R.G. Shotter und K.M. Johnston,
J. chem. Soc. 1968, 123

51. W. Manchot,
Ann. 387, 285 (1912)

52. A.J. Boulton und A.R. Katritzky,
Spectrochim. Acta 17, 238 (1961)

53. H. Feuer und Sh. Markofsky,
J. org. Chem. 29, 935 (1964)

54. E. Jenny,
Helv. Chim. Acta 46, 543 (1963)

55. H. Nakata et al.,
Org. Mass. Spectrom. 1, 199 (1968)

56. H. Nakata et al.,
Tetrahedron Letters 1968, 379

57. G. Weitzel, F. Schneider, A.-M. Fretzdorff, J. Durst
und W.-D. Hirschmann,
Z. physiol. Chem. 348, 433 (1967)

58. Ph. Seeman,
Biochem. Pharm. 15, 1632 (1966)

59. W.E. Dulin und G.C. Gerritsen,
Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol. 23, 502 (1964)

60. M. Rodbell,
J. biol. Chem. 239, 375 (1964)

61. P. Dieterle, C. Wülfert-Heldrich, J. Henner und
K. Schwarz,
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 153 (1968)

62. V.T. Poetova et al.,
Vop Biofiz. Biokhim. Patol. Eritrotsitov, Akad. Nauk SSSR., Sib. Otd. Just. Fiz. 1967, 81
Referat: C.A. 68, 1976 r

63. A.C. Allison,
Br. med. Bull. 24 (2), 135 (1968)

64. G. Hedestrand,
Z. physiol. Chem. (B), 2, 428 (1929)

65. J. Elovson,
Biochim. biophysica Acta 84, 275 (1964)

66. G. Weitzel, F. Schneider, A.-M. Fretzdorff, J. Durst, W.-D. Hirschmann,
Z. physiol. Chem. 348, 433 (1967)

67. G. Weitzel, F. Schneider, H. Guglielmi, J. Sander, J. Durst. W.-D. Hirschmann,
Z. physiol. Chem. 346, 208 (1966)

68. W. Heptner und O. Christ,
Diabetologia 3, 443 (1967)

69. J. Glieman,
Diabetologia 3, 382 (1967)

Lebenslauf

Am fünften April 1940 wurde ich als einziges Kind des Steigers Philipp Gerwert und seiner Ehefrau Gertrud geb. Gebhardt in Neunkirchen (Saar) geboren.

In Spiesen (Kreis Ottweiler) besuchte ich die Volksschule. Nach der vierten Klasse trat ich in das Mädchenrealgymnasium in Neunkirchen ein und entschied mich für den sprachlichen Zug. Im Frühjahr 1959 bestand ich dort das Abitur und entschloß mich, an der Universität Tübingen Chemie zu studieren mit dem Studienziel der Diplomchemikerin.

Im Mai 1963 bestand ich in Tübingen das Vordiplom und im Dezember 1965 die Diplomhauptprüfung. Danach führte ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Opitz die Diplomarbeit durch. Im Juli 1967 begann ich mit der Bearbeitung des in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Themas unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel am Physiologisch-Chemischen Institut. Seit Oktober 1969 bin ich als Verwalter einer Assistentenstelle bei der Universität Tübingen angestellt.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Physik und Mathematik: H. Krüger, G. Möllenstedt, R. Mühleisen und W. Schweizer;

in Chemie: E. Bayer, K. Brodersen, W. Bues, M. Hanack, H. Hellmann, G. Kortüm, F. Lingens, H. Mauser, E. Müller, G. Opitz, W. Rüdorff, H. Suhr;

in Physiologischer Chemie: G. Weitzel und F. Schneider.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen